# テキスト

# (高速) 原子間力顕微鏡の基礎とナノバイオへの展開

第1回文部科学省ナノテクノロジーサマースクール「生命現象を知る」(ナノバイオ領域)

# 高速バイオ原子間力顕微鏡

安藤 敏夫

金沢大学大学院(自然科学研究科)

**CREST/JST** 



60 ms/ frame

@ 人材開発センター富士研修所、8月24-26日, 2006年

目次

はじめに	4
1. 走査型プローブ顕微鏡	4
2. AFM の原理と走査手法	6
3. AFM 装置の構成	9
3-1.AFM システムの概略	
3-2.カンチレバー	
3-3.光テコ法	
3-4.振幅計測	
3-5.スキャナー	
3-6.フィードバック制御	
4. AFM の空間分解能	14
4-1.空間分解能(試料に働く力の影響)	
4-2.空間分解能(針の太さの影響)	
4-3.空間分解能(ピクセルの大きさ)	
5. AFM の時間分解能	17
5-1.画像取得時間とフィードバック帯域との関係	
5-2.パラシューティング時間	
6. 伝達関数	20
6-1.伝達関数とは	
6-2.伝達関数の応用	
7. 高速 AFM	25
7-1.高速走査用カンチレバー	
7-2.高速振幅計測回路	
7-3.光テコ光学系	
7-4.高速スキャナー	
7-5.高速スキャナーのアクティブダンピング	
7-6.動的 PID 制御法(探針・試料間にかかる力の低減化)	
7-7.カンチレバーの励振効率のドリフト補償	
8. 初期のイメージング	33
8-1.通常の撮影速度での動態イメージング	
8-2.高速 AFM による初期の動態イメージング	
9. 最新の高速 AFM による動態イメージング	35
9-1.アクチンフィラメントの滑り運動	
9-2.ダイニン C	
9-3.GroEL-GroESの結合(1)	
9-4.脂質平面二重層膜の形成過程	
9-5.アクチンフィラメントに沿ったミオシン V の運動	
9-6.GroEL-GroESの結合(2)	
10. 次世代高速 AFM に向けた開発	41
10-1.光・熱膨張効果を利用したカンチレバーの励振動と変位駆動	
10-2.位相イメージング	

10-3.フィードフォワード制御法	
10-4.AFM 像を原子モデルに照らして理解	
10-5.探針の先鋭化	
<b>11</b> . 1 分子力学計測	51
11-1.Force Modulation と粘弾性イメージング	
11-2.破断(結合)力に関する理論	
おわりに	62
付録 Α カンチレバーの力学	63
A-1.静力学	
A-2.動力学	
付録 B PID 制御のシミュレーション	66
付録 C Q值制御	67
付録 D フォースカーブ	72
付録 E _ 針の太さの影響(像の再構成)	74
付録 F 針の太さの影響	77
参考文献	78

<u></u>	+2 -	++-	+r
豕る	Ë,	X	FIT

#### 原子間力顕微鏡の基礎とナノバイオへの展開

はじめに

色々な光学顕微鏡のうち、入射光を除外しタンパク質からの散乱光だけを集めて観察する暗視野 顕微鏡や、タンパク質に付けた蛍光分子からの蛍光を観察する蛍光顕微鏡では、そのタンパク質の 動的な振る舞いをビデオレート(33 フレーム/秒)で、時にはもっと速く映像として観察するこ とが可能である。最近では蛍光を発するタンパク質である GFP と融合させた特定のタンパク質を 細胞内で発現させ、そのタンパク質の細胞内でのダイナミックな挙動を観察することも行われてい る。しかし、ここで言う動的な振る舞いとはタンパク質が存在する位置の変化(並進運動や回転運 動)であり、タンパク質の微細な構造形態の変化という意味での動的な振る舞いではない。光を使 って見る顕微鏡では空間解像度に限界があり、タンパク質分子の微細形態をナノ解像度で見ること はできない。個々のタンパク質分子の微細な構造形態観察はこれまで電子顕微鏡によって行われて きた。数十 kV の電圧で加速した電子線の波長は 0.01 nm 程度であり、空間解像度は光学顕微鏡の それをはるかにしのぐ。しかし、光に比べ電子線は物体に吸収されやすく、試料を真空中に置かな ければならない。つまり、試料は乾燥状態にある。喩えて言えば、スルメを見てイカを想像しなけ ればならない。試料を急速凍結して或る状態にフリーズされたタンパク質を見ることは可能だが、 タンパク質の動的な連続的振る舞いを電子顕微鏡で観察することは原理的に不可能なのである。液 体中に在る試料のナノ解像度の構造形態の観察は原子間力顕微鏡の誕生(1986 年)によって初め て可能になった。原子間力顕微鏡は走査型プローブ顕微鏡と一般に呼ばれる顕微鏡のひとつであり、 機械走査方式を採用しているため1画像の撮影にかなり長い時間を要し、タンパク質の動的振る舞 いを観察することは到底不可能と思われていた。2001 年に原子間力顕微鏡の撮影速度は飛躍的に 向上し、水溶液中で動くタンパク質などの高分子観察がようやく可能になった。原子間力顕微鏡は 他の顕微鏡と比べオートマチックな装置とは言えず、ユーザーに任される操作が多い。それ故、ユ ーザーが基本的なことを押さえておかないと装置の能力を最大限に発揮できない。この教科書では、 原子間力顕微鏡の仕組みをきちんと理解して利用できるばかりでなく、自ら装置を製作したり市販 の装置を改良するのに必要な基本的なことがらについても詳しい説明を行う。装置は買って使うも のという考えでは、他の研究者と違うユニークな研究をすることは難しい。また、サイエンスと技 術は車の両輪であり、技術の進歩によりサイエンスが発達し、また、サイエンスの発達により技術 が進歩するのである。サイエンスの発展に貢献し人類の知的財産を築くためには、技術についても 深い理解が必要であるし、自ら新しい技術を生み出す努力も必要である。

# 1. 走査型プローブ顕微鏡

走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscope; 略称 SPM)とは次のような共通装置構成 および原理をもつ様々な顕微鏡の総称である。装置に共通な基本要素は試料ステージスキャナー、 プローブ、検出器である(図1-1)。スキャナーのΖ方向の移動により試料とプローブを接近あるい は接触させ、そのときプローブに現れる何らかの物理量の変化(ΔI)を検出器で捉える。スキャ ナーにより基板をXY面に走査して、試料各点でのΔIを計測し、求めたΔIをZ軸に、走査各点 をXY軸にとってグラフにすると、試料の性状が画像として再現される。試料の捉えるべき性状と 検出する物理量に応じて、異なるプローブが使用され、様々なタイプのSPMが存在する。代表的 なものとして、試料・プローブ間に流れるトンネル電流に基づき画像を得る走査型トンネル顕微鏡 (Scanning Tunneling Microscope;略称STM)、試料・プローブ間に働く力に基づき画像を得る原 子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope;略称 AFM)、光・試料間の相互作用に基づき画像を得る 走査型近接場光学顕微鏡 (Scanning Near-field Optical Microscope;略称 SNOM)、プローブ・試料 間で起こる電気化学反応に基づく電気化学STMなどがある。力に基づくものであっても、磁気力、 静電気力などに特化したものには、それぞれに別称が与えられている。これまでに開発されたSPM 以外にも新しいSPMが作り出される可能性が未だある。以下にSTMとSNOMについて簡単に触 れておこう。



図1-1:走査型プローブ顕微鏡(SPM)の基本装置構成の概念図。

STM:数ある SPM のうち STM が最初に Binnig らにより開発された。STM ではプローブとして先端を尖らせた白金イリジウムやタングステン探針、あるいはカーボンナノチューブが用いられる。 導電性の試料ステージと探針との間に仕事関数Φより低いバイアス電圧( $V_B$ )をかけて探針と試料を数+Å以下の距離まで近づけていくと、電子はポテンシャル障壁をトンネルし、トンネル電流 $J_T$ が流れる。トンネルする電子は探針先端に局在する原子を通ると考えられ、それ故、STM はXY 方向については原子解像度を持ちえる。 $J_T$ は探針と試料表面間の距離 zに対して $J_T \approx \exp(-2z/\lambda)$ のように変化する。ここで減衰距離λは電子質量 mとΦの関数で、

 $\lambda = \hbar / \sqrt{2m\Phi}$  と表される。通常の金属では $\Phi$ は 1~5eV であるので、 $\lambda$ は 1Å前後となり、 $J_{\tau}$ は

zに極めて敏感になる。従って、STM は Z 方向については 0.01 Å オーダーの解像度を持ちえる。 通常 XY 走査中に $J_T$ を一定に保つように z を変化させる定電流モードが用いられる。試料各点で  $V_B$ を変化させ $J_T - V_B$ 特性を求め、表面の電子状態密度を反映した像を求めることもできる。STM の原理から明らかなように、試料は導電性でなければならないし、電解質溶液中の試料を観察でき ないという制約がある。それ故、導電性材料表面の電子特性の研究に広く用いられている。生体高 分子に利用されることは少ないが、DNA の高解像観察にも用いられている。DNA 自身が導電性で あるという報告もあるが、トンネル電流が実際どこを流れているのかは不明である。 SNOM: 可視光の波長は 400~700nm であり、回折効果により光学顕微鏡の空間分解能はせいぜい 数百 nm に制限される。波長より短い微小開口に光を入射したり、光を全反射させると物質境界面 の極めて近傍(ニアフィールド)にだけ光が局在するようになる(エバネッセント光)。このニア フィールドに試料を置くと、その局在した光は試料と相互作用し、遠くに伝播する光に変換される (散乱光)。この現象を試料走査と組み合わせた顕微鏡が照明タイプの SNOM である(図 1-2)。検 出されるファーフィールドの光の強度が一定になるように走査すると、その走査は試料形状をなぞ ったことになる。試料が蛍光色素で染色されている場合には、形状と同時に蛍光像を得ることがで きる。通常の光で試料を照明した場合でも試料近傍にはエバネッセント光が生ずる。そこに微小開 口を置くと、開口の反対側に伝播光が生ずる。これを利用した SPM が集光タイプの SNOM である。 いずれのタイプでも SNOM の XY 方向の空間分解能は現在の所せいぜい 50nm 前後である。AFM のカンチレバー探針先端を微小開口とする仕方で AFM と SNOM を組み合わせた装置もある。



図 1-2: SNOM の色々なモード。

# 2. AFM の原理と走査手法

AFM のプローブは一般にカンチレバー (Cantilever: 片持ち梁の意味)と呼ばれ、柔 らかいレバーの先に先端の尖った針が付いた ものである(図 2-1)。これは光学顕微鏡の対 物レンズに対応し、ナノ世界とマクロな世界 とをつなぐ。針先端が試料表面と接して力が かかるとその力に比例してレバーは撓む。こ の撓み量を何らかの方法で計測することで、 針・試料間に働く力を求めることができる。 従って、AFM が捉える物理量の変化⊿I は力 の変化である。最も単純な走査モードである Constant Height モードでは、試料ステージと



**図 2-1**: 代表的なカンチレバーと探針部の電子顕微鏡写 真。(a) 三角形カンチレバー、(b) (a)の四角で囲った探 針部分の拡大図、(c) 短冊形カンチレバー、(d) EBD 探 針。



**図 2-2**: AFM の 3 つの走査モードの概念図。(a) Constant Height モード、(b) Constant Force モード、(c) Tapping モード。

カンチレバー支持部の間の高さを一定にして試料を XY 走査する(図 2-2a)。このとき針先端は試 料をなぞるのでレバーは試料の凹凸に応じて撓む。撓み量を Z 軸に、XY 走査各点を XY 軸にとる と、試料の凹凸像(トポグラフィー)がグラフに再現される。この凹凸像形成の原理から明らかな ように、AFM では試料が導電性でも絶縁性でも構わないと同時に、試料の環境(真空中、大気中、 液中)を選ばないという優れた特徴を有する。それ故、AFM は生体試料に最も利用されている SPM である。ところで、ここまでの説明は近似としては正しいが必ずしも正確ではない。試料がカンチ レバーに比べて十分硬い場合には、カンチレバーの撓みは試料の凹凸形状を正確に反映するが、そ うでない場合には試料が変形し正確ではない。試料の高さが大きい所ほど試料・探針間に働く力が 大きくなり、その分試料の高さ方向の変形が大きくなる。この誤差を小さくするためには、試料・ 探針間に働く力をできるだけ小さく且つ一定に保って走査する必要がある。この走査モードを Constant Force モードと呼ぶ(図 2-2b)。カンチレバーの撓みを検出し、その撓み量と目標とする 撓み量(目標値:Setpointと通常呼ばれる)との差を計算し、その差がゼロになるまで試料ステー ジを上もしくは下に変位させる(フィードバック制御)。この工夫により、試料の高さによらず一 定の小さい力をかけた状態を維持することができる。しかし、探針が試料に常に接した状態でXY Z走査が行われるため、試料に横方向の力もかかる。特に急に高くなる箇所や、探針が強く吸着す る箇所では横方向の力は強くなる。この横方向の力でもカンチレバーは撓み得るので、撓みから読 み取る高さ情報に誤差が生ずる(付録 A 参照)。更に、試料が基板に緩くしか吸着していない場合 には、試料はこの横方向の力で掃かれてしまうことも起こりうる。横方向の力を極力軽減する新し い走査手法が 1994 年に考案された。Constant Height 及び Constant Force モードを DC モードと 呼ぶのに対して、この新しい走査モードは一般に AC モード(或いは、Dynamic モード)と呼ばれ る。このモードではカンチレバーをその共振周波数(付近)でZ方向に振動させる。上下に振動す るカンチレバーのスウィングの底で探針は試料をたたくので、Intermittent Contact モード 或は Tapping モード(Veeco 社(元は DI 社)の登録商標)とも呼ばれる(図 2-2c)(これ以降、Tapping モードと呼ぶことにする)。XY走査中カンチレバーは絶えず上下に振動しているので横方向の力 はほとんどかからない。探針が試料をたたくと、カンチレバーの振幅は減少する。この減少の仕方 は大気中と液中では異なる。大気中(真空中も同様)では、カンチレバーのスウイングの底(探針 が試料と接する)と頂上の両方で振幅が同程度減少するのに対して(図 2-3a)、液中ではスウィン グの底でのみ振幅が減少する(図 2-3b)。この違いはダンピング(粘性抵抗)の大小に起因してい る。大気中ではダンピングが小さく、それ故、カンチレバーの質量による慣性が常に働いているの に対し、液中ではダンピングが大きく、慣性がほとんど無視できるためである。言い方を換えれば、 液中ではカンチレバーを振動させる励振力によってのみ振動が持続する(励振力が無くなれば直ち



図2-3: 基板に近づけていったときの振動するカンチレバーの大気中と液中での振舞いの違い。横軸: 基板の位置、縦軸: 太い実線はカンチレバーの変位の DC 成分、細い実線はカンチレバーの変位、破線はカンチレバーの振幅を表す。1 と2 の間では探針と基板は完全に離れており、矢印の部分で探針は基板に接触し始める。2 と3の間で基板はカンチレバーを押し込んでいき、カンチレバーの振幅は減少していく。3 の位置で振幅はゼロになる。3 と4 の間ではカンチレバーは基板に押し込まれた分だけ変位する。(a) 大気中(真空中)での振舞い。2 と3 の間のカンチレバーの振幅の減少の傾きは 1.0 である。(b) 液中での振舞い。2 と3 の間のカンチレバーの振幅の減少の傾きは 0.5 である。

に振動は止む)のに対し、大気中では励振力が無くなっても慣性のために振動はしばらく持続する ため、振幅の減少の仕方に違いが生ずる。Tapping モードでも、カンチレバーの振幅を一定(すな わち、探針・試料間にかかる力を一定)にするために、試料ステージを上下に変位させるフィード バック制御は通常行われる。AFM による生物試料観察の拡大に Tapping モードは重要な貢献をし た。Tapping モードが考案される以前では、基板に強く吸着する試料しか観察できず、強く吸着さ せるための工夫が要求された。液中で強く吸着させることができない場合には、試料を基板上で乾 燥させて基板に強く吸着させることが広く行われていた。水溶液中の試料でも観察できるという AFM の最大の利点は、Tapping モードによって初めて活かされたと言えるのである。図 2-4 にカン チレバーの励振法を示す。



図 2-4: カンチレバーの励振法。音響励振では、ピエゾ素子を振動させて その振動をカンチレバーに伝えて励振する。磁気励振ではカンチレバー を磁性コートするか磁性粒子を付けて、交流磁場で励振する。自己励振 では、カンチレバーに圧電材料である ZnO などをコートし、それに交流 電圧をかけて振動させる。

#### 3. AFM 装置の構成

# 3.1. AFM システムの概略

図 3-1 に一般的な AFM システムの概 略を示す。ここでは Tapping モードにお ける構成で説明するが、Constant Force モードでは励振用ピエゾと RMS-DC コ ンバーターが無い点を除いては同様な 構成である。カンチレバーの励振は、通 常カンチレバーホルダーの近くに設置 したピエゾ素子を振動させて行う。この 振動の周波数をカンチレバーの共振周 波数に一致させるとカンチレバーが選 択的に励振されるが、カンチレバーホル ダーなども同様な周波数帯域に共振点 をもつこともあり、周波数を変えていく とカンレバーが振動しやすい周波数が



図3-1: AFM 装置の概念図(本文参照)。

何箇所か観察される(Forest of Peaks と呼ばれる)。予めカンチレバーの熱揺らぎのピーク周波数 を計測して、その周波数(付近)で励振する必要がある。Forest of Peaks を避けるためにはカン チレバーに直接力をかけて振動させるしかないが、カンチレバーを強磁性体でコートして、交流を 通じたコイルによる磁場で励振させることも行われている。カンチレバーの変位(撓み)計測には これまでいくつかの方法が使われてきたが、構成が最も単純な光テコ法が一般的である。カンチレ バーの片面、或は、両面は通常金コートされ小さい鏡になっており、レンズで絞った半導体レーザ ー光を当て、反射光を2分割フォトダイオード(SPD)に導く。カンチレバーの撓みにより反射角 度が変化し、SPD に当たるレーザービームの中心位置がずれ、2つのフォトダイオード電流(電 圧)の差が変化する。従って、この差の変化からカンチレバーの変位を計測できる。カンチレバー がサイン波で振動していれば、SPD の差動アンプの出力も同様にサイン波で振動する。このアン プ出力を RMS-DC コンバーターに入力して、サイン波の RMS 信号(振幅の $\sqrt{2}$ 分の1の信号)に 変換する。RMS 信号を PID(比例・積分・微分)フィードバック回路に入力し、入力された RMS 値と目標とする RMS 値(目標値)との差に応じた信号を出力して、この差がゼロになるまで試料 ステージを乙方向に変位させる。試料ステージをXY方向に変位させながら上述のフィードバック を行うと、試料ステージは試料の凹凸をなぞる運動を行うことになる。従って、試料ステージをX Y Z に動かすためにスキャナーに加えた電圧をパソコンで読み取って、3 次元のグラフを描くと試 料の形状が再現されることになる。XY走査の信号は予め設定しておくので、実際にはZ走査の信 号のみを読み取るだけでよい。以下では上記の概略に現れたデバイスなどについてもう少し詳しく 説明する。

# 3.2 カンチレバー

図 2-1a,c に示したように三角形のものと短冊形のものが市販されている。凹凸像を撮る場合に は横方向の力で捩れにくい三角形のものが通常使われる。ここでは説明を省略するが、短冊形のも のは横方向の力で捩れやすく、摩擦像を撮るために使われることが多い。材質は窒化シリコンもし くは単結晶シリコンで、柔らかいカンチレバー(バネ定数 6~400 pN/nm 程度)には一般に窒化シ リコン、硬いカンチレバー(バネ定数 1,000~70,000 pN/nm 程度)には単結晶シリコンが用いられ ている。柔らかく共振周波数の低いカンチレバー(大気中共振周波数 10~20kHz)は一般に Constant Force モードで利用され、硬く共振周波数の高いカンチレバー(大気中共振周波 150~400kHz)は Tapping モード(或は大気中及び真空中のノンコンタクト AC モード)で利用されることが多い。 長さ *L*、幅 w、厚さ *d* の短冊形のカンチレバーのばね定数  $k_c$ と共振周波数  $f_c$  は以下の式で与えら れる。

$$k_c = \frac{wd^3}{4L^3}E\tag{3-1}$$

$$f_c = 0.56 \frac{d}{L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}$$
 (3-2)

ここで、Eとpはそれぞれ材質のヤング率と密度である。柔らかく且つ共振周波数の高い理想的な カンチレバーは、式(1)(2)から明らかなように小さくなければならず、まだ市販されていない。三 角形カンチレバーの力学特性をサイズなどのパラメータで厳密に表現することは難しいが、三角の 2 辺を短冊形2枚から成るとして十分近似できることが分かっている。探針先端の曲率半径は空間 解像度を決める重要なファクターであるが、10-15 nm が一般的である。カーボンナノチューブを 探針としたカンチレバー作成法も開発され、市販されている。電子顕微鏡を用いて電子線を1 点に 当て続けることにより、コンタミネーションガスを針状に重合させる EBD (Eectron Beam Deposition)法も利用されている(図 2-1d)。ここでコンタミネーションガスとは、電子顕微鏡試 料室に若干混ざっているガスであり、真空装置のオイルから来ており、主成分は炭素である。探針 の成長速度は5 nm/s 程度である。電子顕微鏡のいくつかのパラメータにより先端曲率半径は影響 されるが、作動距離が短いほど、スポットサイズが小さいほど小さくなり、先端曲率半径 5-9 nm の探針を容易に作ることができる。コンタミネーションガスとは別にメタンなどのガスを積極的に 導入すると針の成長速度は著しく増すが、針先端の曲率半径は大きくなる。ガスを高周波電界でプ ラズマ化してターゲットに強くぶつけて削るプラズマエッチング装置を用いると、探針を更に細く 尖らせることができる(10-5 節参照)。

# 3.3 光テコ法

カンチレバーの撓み変位の計測にはいくつかの方法が採用されてきた。AFM の発明者である Binnig は最初、STM の探針と導電性レバー間に流れるトンネル電流を利用した。その後、光干渉 法、臨界角プリズム法、光テコ法が用いられるようになったが、デザインがもっとも単純であると いう理由(感度・精度が最も高いからという理由ではない)から光テコ法が現在では主流である(図 3-1 参照)。カンチレバー先端付近の変位δzと傾きの変化δθとの間には、

$$\delta z = \frac{3L\delta\theta}{2} \tag{3-3}$$

という関係がある。ここで L はレバーの長さである。カンチレバー先端が $\delta \theta$ 傾くと、レーザーの反射角は 2 $\delta \theta$ 変わるので、カンチレバーと SPD の間の距離を Dとすると、SPD 位置での反射

レーザースポット位置の変化  $\delta d$  は 2D  $\delta \theta$  となる。SPD 位置でのレーザースポットの直径を 2d とすると、各フォトダイオードに当たるレーザー光強度の差の挿入射光量に対する割合は

$$\frac{\delta d}{d} = \frac{2D\delta\theta}{d} = \frac{4D\delta z}{3Ld}$$
(3-4)

になる。Dを大きくすればこの割合が大きくなるように思われるが、Dを大きくすれば d も比例し て大きくなるので、割合は D には依存しない。D/d はレーザーを絞る角度で決まるが(角度が小さ いほど D/d は大きくなる)、カンチレバーにレーザー光を小さいスポットで絞るためには、角度を ある程度大きくしなければならない。計測の仕方にもよるが、光テコ法により 0.2 nm 程度の小さ い変位 δ z を容易に計測できる。

#### 3.4 振幅計測

カンチレバーをその共振周波数  $f_c$  (= $\omega_c/2\pi$ )で励振させた場合を考える。カンチレバーの振幅は、フィードバック制御下でも、探針・試料間の相互作用で絶えず変動している。サイン波形状の周期的な凹凸をもつ試料をX走査した場合を考える。スイングの頂点及び底の両方で振幅が変化すると仮定すると、カンチレバー先端付近のZ方向の変位  $z_c$  は

 $z_{c} = (A_{0} - \varepsilon (1 + \sin \omega t)) \sin \omega_{c} t$ (3-5)

のように表せる。ここで、括弧内の第一項  $A_0$  は相互作用のないときの振幅であり、第 2 項は試料 との相互作用による振幅の変調を表す。カンチレバーの共振の項と変調の項の掛け算により  $z_c$  は 式(3-6)のように直せるので、カンチレバーの振動には、カンチレバーの共振周波数  $f_c$  の前後の周 波数、  $f_c + f \ge f_c - f$  の周波数も現れる ( $f \equiv \omega/2\pi$ )。

$$z_{c} = (A_{0} - \varepsilon) \sin \omega_{c} t - \frac{1}{2} \varepsilon [\cos(\omega_{c} + \omega)t + \cos(\omega_{c} - \omega)t]$$
(3-6)

従って、SPD の作動アンプからの出力を f<sub>c</sub>を中心として幅2fより若干広いバンドパスフィルタ ーを通しても探針・試料間の相互作用情報は全く失われない。このバンドパスを通すことでノイズ を大幅に除去することができる。DC 成分から試料との相互作用によって現れる周波数の成分まで 検出しなければならい DC 走査モードとは対照的である。サイン波の最大振幅の√2分の1を出力 する RMS-DC コンバーターは通常、入力信号から絶対値信号を作りそれをコンデンサーで平滑化 することで RMS 値に変換する。この平滑化には搬送波(カンチレバーの共振振動波)の数周期分 以上の時間がかかる。言い換えると、探針と試料との相互作用によって現れる振幅の変調周波数は カンチレバーの共振周波数の数分の1以下でなければならないということである。

#### 3.5 スキャナー

走査型プローブ顕微鏡は機械走査によりイメージングを行う顕微鏡であり、試料ステージ或はカ ンチレバーをXYZ走査するスキャナーの精度は極めて重要である。スキャナーのアクチュエータ として圧電(ピエゾ)素子が使われている。ピエゾ素子は極板間に分極させた強誘電体圧電材料を 挟んだものであり、極板間に電圧を加えると変形する。電界の方向(分極方向)に垂直な方向の変 位を利用する横効果振動子、逆に電界方向(分極方向)の変位を利用する縦効果振動子がある(図 3-2 参照)。分極方向と電界方向を直交させて、それらの方向を含む面内にズレ変位を生ずるように した厚み滑り振動子もある。ピエゾ素子の変位率は 0.03%程度である。一軸にしか変位しないピエ



図 3-2: 色々な変位モードをもつピエゾ素子の例。太い矢印は圧電体の分極方向を、細い矢印は変位 方向を表す。灰色で塗った面及びそれに対向する面には電極が付き、その間に電界がかかる。(a) 横 効果振動子(棒の伸び振動)、(b)縦効果振動子(棒の縦振動)、(c)厚み滑り縦効果振動子。

ゾ素子を3 軸直交するように組み合わせたト ライポッド型スキャナー、円筒ピエゾ素子の外 側に対向する4つの電極、内側にひとつの電極 を付けた円筒型スキャナーがAFMのスキャナ ーとして用いられてきた(図3-3)。図の矢印 の部分に試料ステージを置く。現在市販されて いる装置では、構造が単純な円筒型スキャナー が主流である。内側の電極を基準として4つの 電極に等しい電圧をかければ円筒はZ方向に



図 3-3: 通常の AFM に使われる代表的なスキャナーの構造。(a) トライポッド型、(b) 円筒型。

しか伸縮しないが、外側の対向する電極に異なる電圧をかけると、円筒はその対向する方向にゆが む(円筒の自由端は円弧を描く)。円筒はゆがむ量よりもずっと長いので、この円弧は直線と考え てよく、円筒の自由端は水平方向に変位する。トライポッド型スキャナーでも3軸間変位は互いに 干渉するが、腕の長さが変位に比べて十分長く、干渉は無視できる。いずれのタイプも軸間干渉を 無視できるようにするためにサイズが大きくなり、スキャナーの共振周波数が低くなるという欠点 がある。これが AFM の走査速度を下げている大きな原因となっている。

ピエゾの変位はヒステリシスをもつ。つまり、ピエゾ素子を伸ばしていって再度短縮させていっ た場合に、加えた電圧と変位との関係は同じ経路をたどらない。XY走査におけるヒステリシス補 正の仕方にはいくつかの方法がある。XY走査範囲は既知であるので、その範囲でのヒステリシス 特性を予め求めておき、それを補正する走査データをXY走査信号発生器のメモリーに入れておく ことで、線形性が保証される。静電容量センサーなどを用いて変位量を実際に計測するか、ピエゾ 素子の外壁に現れる誘導電荷(変位量に比例)を計測し、ピエゾドライブ電源にフィードバックを かけながら走査する方法も用いられている。Z方向の走査は既知ではないので、センサーで変位を 検出しフィードバックするのが理想ではあるが、応答の速い高分解能センサーが存在しないので非 線形性を補正することはできない(遅くても構わない場合には補正可能で、そのような補正機構を (備えたものが市販されている)。ここで注意しなければならないのは、非線形性が補正されていな いことが、Zフィードバックの不正確さを意味しないという点である。Zフィードバックによる試 料ステージの動きは試料表面を正確になぞっているのであるが、Zピエゾドライブ電源に印加した 電圧を変位に換算する段階で非線形性によるエラーが入り込んでいるのである。カンチレバーの振 幅は2分割フォトダイオード・アンプ及び RMS-DC コンバーターで常にモニターされており、PID 出力は、ピエゾ素子の非線形性の有無にかかわらず、振幅を一定するようにZピエゾを伸縮してい る(つまり、試料ステージは試料の凹凸に追随している)。ピエゾ素子のヒステリシスは、しかし、

変位量が小さい場合には無視できる程度であり、XYZすべてにヒステリシス補正を行わない市販 AFM は多い。

#### 3.6 フィードバック制御

図 3-4 にフィードバックループのブロック図を示す。ここで制御対象は試料ステージ・試料・カンチレバーから成る系であり、X Y 走査による試料の高さの変化はこの制御対象に対する外乱と捉える。操作量 m は Z スキャナーに加える電圧であり、制御量 c は RMS-DC 値である(DC 走査モードでは SPD 差動アンプの出力)。調節操作系は、目標値と制御量との誤差 e を適当に増幅・演算し、誤差 e をゼロにするように操作量 m を決める。調節操作の方式には何種類かあるが、ここでは広く利用されている PID(比例・積分・微分)制御について簡単に触れておく。



図3-4: Tapping 走査モードにおけるフィードバックループのブロック図(本文参照)。

外乱がなく、誤差eがゼロになっているときの操作量を $m_0$ とする。PID 制御では操作量mと誤差 eとの関係は以下の式で与えられる。

$$m = m_{0} + K_{p} \left( e + \frac{1}{T_{I}} \int_{0}^{t} e \, dt + T_{D} \, \frac{de}{dt} \right)$$
(3-7)

PID 制御は3つのパラメータ $K_n$ 、 $T_I$ 、 $T_D$ をもち、それぞれ、比例ゲイン、積分時間、微分時間

と呼ばれる。式(3-7)の右辺第二項の中に含まれる操作を順番に比例操作、積分操作、微分操作と呼ぶ。誤差 e がステップ状に現れた場合を考えよう。比例操作は、最初大きな操作量変化を与え、その結果誤差 e が小さくなるにつれて小さな操作量変化を与えることになる。しかし、誤差 e がゼロになると操作量が m<sub>0</sub>に戻ってしまい、その結果再び誤差が現れてしまう。従って、比例操作だけでは誤差 e を完全にゼロにすることはできず、誤差 e は常にオフセットをもってしまう。比例ゲインを大きくすると誤差 e を小さくする時間は短縮されるが、制御対象などに時間的な遅れが常にあるため、比例ゲインを大きくしすぎると制御量は振動する(ハンチングと呼ばれる)。積分操作は誤差 e を積分するので誤差 e がゼロになっても操作量を維持できるためにオフセットがない。しかし、積分時間を要するために誤差を瞬時にゼロにすることはできないが、比例操作と組み合わせることで(PI操作と呼ぶ)この時間を短縮でき、且つ、オフセットをゼロにできる。微分操作は急激な誤差 e の増大に対して大きな操作量を与え、誤差が減少し始めると操作量を逆向きに変化させるように働く。従って、それ単独での利用はできず、PI操作で生じうる振動を抑制する働きを持つ。フィ

ードバック制御を適切に行うことは AFM イメージングにとって極めて重要であるが、3つのパラ メータK<sub>p</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>D</sub>をどのように選ぶかは容易ではない。制御対象の動特性に合わせる必要があ るが、その動特性を求めることは難しく、動特性にどのようにパラメータを合わせるかを知ること も難しい。PID 制御の3つのパラメータの選択の指針として、Ziegler・Nichols の限界感度法を紹 介しておく。Zスキャナーのピエゾをドライブする電源の出力をステップ状に変化させるか、或は 目標値をステップ状に変化させる。ピエゾドライブ電源出力をステップ状に変化させても、Zスキ ャナーの共振を防ぐためにZピエゾと電源の間にはローパスフィルターが通常設けられており、ス キャナーは振動しない。前述のように、比例操作だけを行い比例ゲインを大きくしていくと制御対 象の時間的な遅れのために制御量が振動するようになる。この振動が起こる直前の比例ゲインを

 $K_c$ 、振動の周期を $T_c$ とする。このとき、3つのパラメータを、 $K_p = 0.6K_c$ 、 $T_I = 0.5T_c$ 、

 $T_D = 0.125T_c$ に選ぶ。PI 制御の場合には、 $K_p = 0.45K_c$ 、 $T_I = 0.83T_c$ に選ぶ。通常、限界感度法

のように PID の制御パラメータを適切に選びそれを固定してイメージングするのが普通であるが、 制御量の動的な変化に応じてパラメータを適宜変化させることも可能である。この点については **7-6 節**で説明する。

# 4. AFM の空間分解能

#### 4.1 空間分解能(試料に働く力の影響)

曲率半径が 10 nm 程度の針先で試料に触って 10 nm 以下の構造を見ることができるのは一見不 思議である。これを理解するには、針先端で触ったときの接触領域半径がどのくらいになるかを知 ることが重要である。試料と針との間に付着力がなく、静的に押し合う場合に適用できる Hertz の 理論で接触領域半径を見積もってみよう。半径  $R_1 \ge R_2$ の弾性球(その材質のヤング率をそれぞれ  $E_1$ 、 $E_2$ 、また、ポアソン比を $\sigma_1$ 、 $\sigma_2$ とする)を力Fで押し付けたときの接触領域半径aとへこ み距離 $\delta$ は、

$$R = R_1 R_2 / (R_1 + R_2), \quad D = (3/4) \left\{ \left( 1 - \sigma_1^2 \right) / E_1 + \left( 1 - \sigma_2^2 \right) / E_2 \right\} \ge 5 \le \le, \quad \forall n \in \mathbb{N}$$

$$a = \left(RDF\right)^{1/3} \tag{4-1}$$

$$\delta = a^2 / R \tag{4-2}$$

で与えられる。曲率半径 10 nm の針先はタンパク質に比べ十分固く変形しないと考え、タンパク 質を半径 20 nm の球と仮定し、タンパク質のヤング率とポアソン比をそれぞれ 2x10<sup>9</sup> N/m<sup>2</sup>、0.25 とすると、10 pN の力がかかった場合の接触領域半径は約 0.3 nm、100 pN の場合には 0.6 nm と なる。タンパク質を対象にした場合のXY方向の理論的解像度は、この接触領域半径でおおよそ決 まると考えてよい。接触領域半径は力の大きさに比例せず、1/3 乗に比例するけれども、高い解像 度を得るにはできるだけ弱い力で走査する必要がある。針先と試料との間に吸着がある場合には更 に大きな力が働くので、XY方向の解像度は悪くなる。タンパク質がへこむ距離を同様に見積もる と、10 pN の力がかかった場合には、約 0.01 nm 程度であり、100 pN の場合には約 0.06 nm 程度 となり、変形は無視できる。Tapping モードではカンチレバーは振動しており、運動エネルギーを もっている。探針が試料と衝突し、撃力が働く。この撃力の効果を見積もっておこう。接触直前の カンチレバーの力学的エネルギーは第一近似として、衝突によりカンチレバーの運動エネルギーが ゼロになったときのタンパク質の変形による弾性エネルギーとカンチレバーの弾性エネルギーの 和に変換されると考えられる。変形のポテンシャルUは、 $-F = -\partial U / \partial \delta$ より、

$$U(\delta) = \delta^{5/2} \frac{2}{5} \sqrt{R} / D \qquad (4-3)$$

で与えられる。それ故、振動するカンチレバーとの衝突によるタンパク質のへこみ距離 $\delta_{0}$ は

$$\frac{1}{2}k_c A_{max}^2 = U(\delta_0) + \frac{1}{2}k_c (A + \delta_0)^2$$
(4-4)

で決まる(連続体であるカンチレバーの弾性エネルギーが 単純なバネの弾性エネルギーとして近似できることにつ いては、**付録 A-2**を参照されたい)。ここで、 $k_c$ はカンチ レバーのバネ定数、 $A_{max}$ はカンチレバー先端の最大振幅、 Aは接触直前のカンチレバー先端の振幅で通常  $0.8A_{max} \sim 0.9A_{max}$ 程度である。 $A + \delta_0$ が振幅の目標値に なる。ここで注意したいのは、撃力の大きさは Tapping 周波数に直接関係せず、カンチレバーのもつ力学的エネル ギーで決まる点である。200 pN/nm のバネ定数をもつカ ンチレバー先端を振幅 5 nm (Peak-to-peak では 10 nm) で振動させ、接触直前のカンチレバー先端の振幅を 4.5 nm としよう。式(4-4)を数値計算すると、 $\delta_0$ =0.32 nm と なり、これより、 $a_0$ =1.5nm となる(働く最大の力は 1.34



図 4-1: Tapping 走査モードにおける探針 とタンパク質との間にかかかる力の目標 値依存性。バネ定数 200 pN/nm のカンチ レバーを最大振幅 2.5 nm で振動させた場 合について計算した。縦軸の力は、探針 がタンパク質を押し込んでいくときに働 く力の平均値を示す。

nNにもなるが、タンパク質を押し込んでいる間にかかる力の平均はこの0.4 倍の536 pNである)。 図 4-1 に最大振幅が 2.5 nm の場合に働く力の平均値を目標値(セットポイント)の関数として示 す。衝突してカンチレバー先端の運動が止まっても、カンチレバーの先端以外の部分は未だ運動が 続いていると考えられるので、第二近似では式(4-4)右辺にこの運動エネルギーが加わる。それ故、 タンパク質の変形は実際にはもう少し小さく、従って探針・試料間に働く力はもう少し小さいと考 えられる。いずれにしても、Tapping モードの空間分解能は Constant Force モードよりも悪く、且 つ、瞬間ではあるが試料に大きな力が働くことが分かる。この弱点をできるだけ回避するには、バ ネ定数が小さく共振周波数の高い理想的なカンチレバーをできる限り小さい振幅で振動させ、目標 (一定)とするカンチレバーの振幅をできるだけ最大振幅近くに設定する必要がある。しかし、目 標値を最大振幅に近づけ過ぎると、探針が試料から完全に離れてしまいやすくなり、イメージング は極めて難しくなる。この困難を克服する工夫については 7-6 節で述べる。ところで、上の議論で はカンチレバーの動特性を考慮していない。カンチレバーの振動がどのように力に関係するかであ るが、カンチレバーの共振のQ値(Quality Factor)が大きく影響する。Q値は共振の鋭さ、或い は、エネルギー散逸のしにくさを表す量である。大雑把に言って、完全なエネルギー散逸には Q 回の振動が必要であり、上で導出した力をQで割った大きさの力が働く。従って、図 4-1 で示す力 をQで割る必要がある。

# 4.2 空間分解能(針の太さの影響)

ここまでの見積もりは針がその先端で試料と接する場合についてのものである。針の側面と試料が接することも 起こる(図 4-2 参照)。針側面で接しても装置は針先端が 試料と接しているとみなすので、その接触位置での針の太 さ分だけ試料が実際より大きく見えてしまうことになる (詳しくは付録 F を参照)。急峻な勾配をもつ試料部分ほ どその影響が大きい。試料の曲率半径 R が探針先端の曲



図 4-2:探針と試料との接触の様子。 細い線は探針の形状を表し、●はその頂 点の位置を示す。



**図 4-3**: 試料の観察像に及ぼす探針の先端曲率半径及び太さの影響を表す模式図<u>。</u>半径 Rの球は試料を表す。探 針先端の曲率半径は r、側面の開き角は 2 $\theta$  である。(a) R < r の場合。  $D = 2\sqrt{rR}$ 。(b) R > r の場合。(c) 同じ 大きさの試料が接している場合。

率半径 rよりも小さいか同程度の場合、試料の幅 2R は幾何学的に考えると  $2\sqrt{r/R}$  倍大きく見えることになる(図 4-3a)。逆に、R > rの場合には、

(4-5)

 $\frac{1+\sin\theta}{\cos\theta} + \frac{r}{R} \frac{1-\sin\theta}{\cos\theta}$ 

倍大きく見えるが、針先端曲率半径よりも針 の開き角度 20の方が与える影響が大きい (図 4-3b)。試料の高さは針先端曲率半径に 影響されずに正確に観察されるが、試料表面 のくぼみの深さはくぼみの淵の大きさに依存 して影響される(図 4-2)。ところで、試料の 大きさが実際よりも大きく見えてしまうこと と、空間分解能とは必ずしも同じではない。 XY方向の空間分解能の定義として、同じ大 きさの球形試料2つが隣同士にあるときそれ らを区別できる最小の試料の大きさと定義す

ると、R < r の条件では、分解能は $\sqrt{2\varepsilon r}$  であ



図 4-4: AFM 像から試料形状への再構成のシミュレーションと実際。(a) 与えた円環の形状(外径 48 nm、内径 20 nm)。(b) 針の太さ(先端曲率半径 5 nm、開き角 20 度)の影響を考慮した擬似 AFM 像。(c) 擬似 AFM 像に 針の太さ効果の除去操作を施した再構成像。(d) Avidin コートしたマイカに吸着させたアクチンフィラメント の束の AFM 像。(e) 針の太さ(先端曲率半径 7 nm、開 き角 20 度)効果の除去操作を施した再構成像。

る(図 **4-3c** 参照)。ここで $\varepsilon$ は、AFM 装置が読み取れる高さの最小値、試料の高さ方向の変形距 離のうち大きい方の値である。例えば、 $\varepsilon$  =0.1 nm、r =10 nm とすると、空間分解能は 1.4 nm と なる。

図 4-2 に示すように、試料に接する針の曲面はひとつの族を形成する。この曲面族の包絡面が試料面になっている。観察像は針曲面の頂点を結んだものになっている(図中の●を結んだもの)。 針曲面が試料の複数点で同時に接した場合には、その複数点間に挟まれた試料の領域は針と接する ことがない。従って、観察像にはその領域の情報は全く含まれないことになる。針先端付近の曲面 形状が分かっている場合には、観察像から真の試料形状に近い像を再構成することが可能である

(付録 E を参照)。針先端付近の曲面形状を求めるための標準試料(基板にアスペクト比の大きい 針がたくさん並んでいる)も市販されている。針の形状を z=t(x,y)、観察像を z=l(x,y)とする。これ ら2つの既知情報から試料形状 z=S(x,y)を再現できる。いろいろな点(x, y, l(x, y))を頂点とする針の 曲面族の点(X, Y)における Z 値を調べると、点(X, Y)に接している針曲面が Z の最小値 Z<sub>min</sub>を与え る。従って、試料形状 S(x,y)は(X, Y, Z<sub>min</sub>)となる。或は次のようにしても同様に再構成できる。観 察像を極めて尖ったスパイク先端の集まりと考え、そのスパイクに針形状を逆さにしたキャップを 被せる。そのときキャップの集団が作る包絡面が試料形状となる。前者の方法を適用したシミュレ ーションとアクチンフィラメントの実例を図4-4に示す。針が接することができない部分を除いて、 観察像から試料形状がよく再現されていることが分かる。この方法は有効と思われるが、あまり利 用されていない。

#### 4.3 空間分解能(ピクセルの大きさ)

X Y方向の空間分解能はこれまで述べてきたように探針の太さや探針・試料間にかかる力に影響 されるが、AFM 像がデジタル像であることからくる限界を忘れてはならない。デジタル方式でデ ータをサンプリングする場合の一般定理(サンプリング定理)によれば、X Y方向の分解能△を得 るためには、画像1 ピクセルの大きさは△/2 以下でなければならない。例えば、2 nm の空間分解 能を得るためには、ピクセルサイズとして1 nm は必要である。ピクセル数を 100x100 とすれば、 走査範囲は 100x100 nm いうことになる。従って、広い範囲を高い分解能で撮るためにはピクセル 数を非常に多くしなければならない。1 画像を撮るのにかかる時間はライン走査数(Y 方向のピク セル数)に比例して長くなるので、空間分解能と時間分解能は背反する関係にある。両者を両立さ せるためには、観察領域を狭くするしかない。

#### 5. AFM の時間分解能

#### 5-1. 画像取得時間とフィードバック帯域との関係

まず、1 画像を取得するのにかかる時間 T と X 方向の走査速度 V<sub>s</sub> との関係は、以下のように表される。

$$T = \frac{2L}{V_{\rm s}} \times N \tag{4-6}$$

ここで、Lは走査範囲、Nは走査線の数である。係数2はX方向に往復するために現れる。許される走査速度は、2つの因子できまる。Xスキャナーが振動しない周波数帯域とフィードバック帯域である。前者は単純であるが、後者については詳しい説明が要る。いま試料がサイン波形状をして

おり、その周期が入であるとしよう。走査により、空間周波数は時間周波数  $V_{s}/\lambda$ に変換される。 この時間周波数は、探針・試料間に働く力を一定に保つために試料ステージをZ方向に走査する周 波数(すなわち、フィードバック周波数)である。フィードバックは「後追い」であるので、試料 のサイン波形状に対して常に遅れて試料ステージを上下することになる。フィードバック帯域とは 通常 45 度の位相遅れが生ずるフィードバック周波数として定義される。フィードバック帯域を $f_b$ とすると、 $f_b > V_s/\lambda$ であるので、式(4-6)は $f_b$ を用いて表すと、

$$T > \frac{2LN}{f_b \lambda} \tag{4-7}$$

となる。例えば、走査範囲を 250nm 四方、100 本の走査線数、試料の大きさを 10nm、1 画像を取得する時間を 1 秒とすると、フィードバック帯域は 5 kHz 以上ということになる。市販の装置ではこの程度、或いは、それ以下のフィードバック帯域しかないので、1 画像取得に 1 秒以上の時間を要する。通常は分のオーダーである。

それでは、フィードバック帯域を制限する要因は何であろうか。タッピングモードで考えると、 カンチレバーの振動振幅が変化してから、試料ステージがZ方向に実際に動くまでの色々なステッ プで時間的な遅れが生ずる。(1)カンチレバーの振幅を計測するのにかかる時間、(2)試料との相互 作用でカンチレバーの振幅が定まるまでの時間、(3)制御回路が働く時間、(4)Zスキャナーが変位 する時間などがある。この他に後で述べる「パラシューティング時間」がある。これらを順に説明 していこう。まず、カンチレバーの振幅を計測する最短時間は、カンチレバーの共振周期の半分の 時間、すなわち、1/2f<sub>c</sub>はどうしてもかかる。振動しているカンチレバーに力がかかったとき、 振幅がある一定の値に一瞬に変化することはできない。カンチレバーは共振周波数で振動している が慣性をもつので直ぐに振幅は変化できない。付録Cに詳細に書いてあるが、結論として、応答時 間は $Q_c / \pi f_c$ となる。ここで、 $Q_c$ は Quality Facotor と呼ばれるもので、共振スペクトルの鋭さを 表す量である。Zスキャナーの応答時間も同様な形で表され、 $Q_s / \pi f_s$ となる(添え字 s はスキ ャナーを表す。あとで説明するパラシューティング時間を $\tau_p$ 、及び特定していない他の時間遅れ

$$\Delta \tau = \frac{1}{2f_c} + \frac{Q_c}{\pi f_c} + \frac{Q_s}{\pi f_s} + \tau_p + \delta$$
(4-8)

となる。45度の位相遅れは、1/8fbに対応するので、結局フィードバック帯域は

$$f_{b} = \frac{1}{8\Delta\tau} = \frac{f_{c}}{8} \left( \frac{1}{2} + \frac{Q_{c}}{\pi} + \frac{Q_{s}f_{c}}{\pi f_{s}} + f_{c}\tau_{p} + f_{c}\delta \right)$$
(4-9)

と表される。

#### 5-2. パラシューティング時間

振動しているカンチレバー探針は試料を叩きながらX方向に走 査しているが、試料の急な下り勾配で探針は試料表面から完全に離 れてしまうことも起こりえる。一旦離れると、カンチレバーの振幅



は自由振動振幅 Ao になる。試料表面に近くても大きく離れていても自由振動振幅のままなので、 振幅の目標値(セットポイント)との差(エラー信号)は一定で飽和している(エラー信号の飽和)。 従って、大きく離れている場合には、試料表面に探針が再着地するまでに時間がかかる(パラシュ ーティングの様に)。この時間がフィードバックの遅れになる。パラシューティング時間がどれく らいかかるかを見積もるのは難しいが、以下のようにしておおよその時間を求めることができる。 試料が高さ h₀のサイン波形状をしていると仮定し、セットポイント(Peak-to-peak で)を A₅とす る。フィードバック走査に位相遅れ $\phi$ があると、カンチレバー探針は「試料形状の残差」 $\Delta S(t)$ を 感じていることになる(パラシューティングがない場合)。 $\Delta S(t)$ (図 5-2)は以下のように表さ れる。

$$\Delta S(t) = \frac{h_0}{2} [sin(2\pi f_b t) - sin(2\pi f_b t - \varphi)] = h_0 sin \frac{\varphi}{2} cos \left(2\pi f_b t - \frac{\varphi}{2}\right)$$
(5-1)  
- h\_0 sin( $\phi/2$ ) cos(2  $\pi f_b$ t)  
- t\_0 0 t\_0 h\_0 sin( $\phi/2$ ) t  
- t\_0 0 t\_0 h\_0 sin( $\phi/2$ ) t  
- 2A\_0(1-r)  
図 5-2: フィードバックの下でカンチレバー探針が感じる試料形状残差。探針が試料から完全に  
離れてしまう領域を灰色で示す。カンチレバーの振動の底で探針が試料表面から離れている距離

離れてしまう領域を灰色で示す。カンチレバーの振動の底で探針が試料表面から離れているの平均値は<
$$d >= \frac{1}{2t_0} \int_{-t_0}^{t_0} \left[-2A_0(1-r) + h_0 \sin(\varphi/2)\cos(2\pi ft)\right] dt$$
で与えられる。こ

$$t_0 = \beta / 2\pi f$$
。この積分の結果は、 $< d >= 2A_0(1-r)(tan \beta / \beta - 1)$ となる。

試料形状残差の高さは h<sub>o</sub>sin(φ/2)であるが、それは(2A<sub>0</sub>-A<sub>s</sub>)よりも小さくなければならない。そう でないとカンチレバーは試料表面から離れてしまう。この条件は、r ≡A<sub>s</sub>/2A<sub>0</sub>の最大値に制限を与え る。即ち、

$$r < 1 - \frac{h_0}{2A_0} \sin\frac{\varphi}{2} \qquad (5-2)$$

パラシューティングの間でも近似として式 (5-1)が成り立っているとしてパラシューティ ング時間を見積もってみよう。離れている平均 距離は $2A_0(1 - r)(tan\beta/\beta - 1)$ , ここで  $\beta$  は cos<sup>-1</sup>[2A<sub>0</sub>(1 - r)/h<sub>0</sub> sin(φ/2)] (図5-2参照)。フィ ードバックのゲインは通常、距離のエラー 2A<sub>0</sub>(1 - r)がカンチレバーの共振の1周期の間 に解消される程度にかけられている。従って、 パラシューティング時間 $\tau_n$ はおおよそ



(5 1)

こで、

図 5-3:フィードバック帯域とセットポイント、 及び、2A<sub>0</sub>/h<sub>0</sub>(試料の高さに対するカンチレバ 一の自由振動振幅との比)との関係。各線に付 いた数字は 2A<sub>0</sub>/h<sub>0</sub>の値。

(tanβ/β - 1)/f。と見積もられる。従って、これを式(4-9)に代入すると、

$$f = \frac{f_c}{8} / \left(\frac{Q_c}{\pi} + \frac{Q_s f_c}{\pi f_s} + f_c \,\delta + \frac{tan\beta}{\beta} - \frac{1}{2}\right)$$
(5-3)

ここで、r が [1 – ( $h_0/2A_0$ )sin( $\pi/8$ )]よりも小さいときには、 $\beta$  はゼロになり、フィードバック帯域は r に無関係になる。図 5-3 に示すように、フィードバック帯域はr の増加とともに減少し、r > 0.9 では急激にゼロに近づいていく(セットポイント効果)。また、 $2A_0/h_0$ (試料の高さに対するカン チレバーの自由振動振幅との比)が小さくなるとフィードバック帯域は低くなる(試料高さの 効果)。

#### 6. 伝達関数

さて、ここでは一旦AFMを離れて、伝達関数について説明しよう。この章のあとに出てくる高 速AFMを開発する話の内容などを理解するには、伝達関数の基礎的な知識が不可欠だからである。

#### 6-1. 伝達関数とは

或るシステムに信号を入力し、その出力を調べることは普遍的な問題である。ここでは、システムとして線形システムを考えるが、力学系、回路など様々である。入力 *f<sub>in</sub>(t)*に対するシステムの 応答 *f<sub>out</sub>(t)*を考えるとき、色々な入力の度に出力を考えるのは面倒である。どんな入力に対して も出力が得られるようにできたら便利である。また、入出力関係を時間で調べることは必ずしもない。時間の代わりに周波数領域で考えた方が見通しをつけやすい面もある。このような手法を助け る数学としてフーリエ変換とかラプラス変換(演算子を *L*[]) がある。ここではラプラス変換を使 うことにする。ラプラス変換の定義は

$$\mathcal{L}[f(t)] = F(s) = \int_{0}^{\infty} f(t)e^{-st}dt \qquad (6-1)$$

で与えられる。t < 0において f(t) = 0 ならば、

$$f(t) \rightarrow F(s), \qquad \frac{df(t)}{dt} \rightarrow sF(s), \qquad \frac{d^2f(t)}{dt^2} \rightarrow s^2F(s)$$
 (6-2)

のように変換される。微分の演算がsをかけることになり、微分方程式を代数演算に変換すること ができる。入力のラプラス変換を $F_{in}(s)$ 、出力のラプラス変換を $F_{out}(s)$ と表すとシステムの特性 はこれらの比 $F_{out}(s)/F_{in}(s)$ で表される。この比をシステムの伝達関数といい、ここではG(s)と表 すことにしよう。G(s)は、実は、システムに単位インパルス(デルタ関数)を入力したときの出力 のラプラス変換になっている。G(s)が分かっていれば、入力 x(t)をシステムに作用させたときの出 力 y(t)は、それぞれのラプラス変換を X(s),Y(s)と表せば、Y(s)=G(s)X(s)となる。逆にラプラス変換 したものから時間の関数としてどのように振舞うかを求めることもできる(逆ラプラス変換)。す なわち、

$$f(t) = \mathcal{L}^{-1}[F(s)] = \frac{1}{2\pi i} \int_{\sigma_1 - i\infty}^{\sigma_1 + i\infty} F(s) e^{st} ds \qquad (6-3)$$

多くの場合実際に積分をしないでも、ラプラス変換の変換表から求めることができる。

以下にいくつか具体例を挙げて、ラプラス変換の意義を考えよう。

質点の運動方程式  $m\ddot{x} + \gamma \dot{x} + kx = f(t)$ の両辺をラプラス変換すると、  $(ms^2 + \gamma s + k)X(s) = F(s)$ となるので、この質点の伝達関数 G(s)は

$$G(s) = \frac{1}{m s^{2} + \gamma s + k} = \frac{1}{k} \frac{\omega_{0}^{2}}{s^{2} + \frac{\omega_{0}}{Q} s + \omega_{0}^{2}} \quad (6-4)$$

となる。ここで、 $\omega_0^2 = k/m$ ,  $Q = m\omega_0 / \gamma$ である。ラプラス変換の変数 $s \ge i\omega$ とおくと、伝達 関数 $G(i\omega)$ は、この質点の変位の外力 f(t)に対する応答の周波数特性を表すことになる。すなわち、 この質点に色々な周波数をもつサイン波(一定の振幅)の外力を作用させたときに、外力に対する 質点の変位の周波数依存性が  $|G(i\omega)|$ 、及び、外力に対する変位の位相の周波数依存性が  $Arg[G(i\omega)]$ で求められる。

もうひとつ具体的な例を考えよう。図 6-1 に示す R C 回路の振る舞いを考える。



図 6-1: R C 回路

回路に流れる電流をI(t)とすると、 $V_{in}(t) = RI(t) + \frac{1}{C} \int_{-\infty}^{t} I(t) dt$ ,  $V_{out}(t) = \frac{1}{C} \int_{-\infty}^{t} I(t) dt$ 。それぞれを ラプラス変換すると、 $X(s) = \left(R + \frac{1}{Cs}\right) \hat{I}(s)$ ,  $Y(s) = \frac{1}{Cs} \hat{I}(s)$ となるので、この RC 回路の伝達関 数は $G(s) = \frac{1}{1+RCs} = \frac{1}{1+s/\omega_0}$ となる。ここで、 $\omega_0 = 1/RC$ とした。 $s = i\omega$ として、 $G(i\omega)$ の

ゲインと位相をグラフで表すと、図 6-2 のようになる。



図 6-2: RC 回路の伝達関数の振幅と位相の周波数スペクトル。

これを見ると分かるように、RC回路は1次ローパスフィルターになっている。低周波の信号を通

すとその振幅はあまり減少しないが、高周波を通すと振幅が大きく減少する。また、位相遅れは周 波数を上げていくと大きくなり、最大位相遅れはπ/2になる。図 6-2のような周波数特性のグラフ をボード線図と呼ぶ。通常はゲインと角周波数は対数を取る。

# 6-2. 伝達関数の応用

# 6-2-1. ブロック線図

いくつかの線形システムをつなげて全体としてどのように システムが振舞うかを調べる必要性が出てくる。フィードバ ック制御はその典型的な例である。ここでは、各システムをブ ロック(ひとつの伝達関数)として、それをつなげた場合に伝 達関数がどのようになるかをまとめておく。

(1) 直列結合

図 6-3 のように伝達関数が直列につながると、Y(s)=G<sub>1</sub>(s)X(s), Z(s)=G<sub>2</sub>(s)Y(s)より、Z(s)=G<sub>1</sub>(s)G<sub>2</sub>(s)X(s)となるので、全体の 伝達関数は各伝達関数の積になる。

(2) 並列結合

図 6-4 のように伝達関数が並列につながると、A(s)=G<sub>1</sub>(s)Z(s), B(s)=G<sub>2</sub>(s)X(s), Y(s)=A(s)+B(s)=[G<sub>1</sub>(s)+G<sub>2</sub>(s)]X(s)となるので、 全体の伝達関数は各伝達関数の和になる。

(3) フィードバック結合

図 6-5 のように G(s)の出力を伝達関数 H(s)を通して入力に戻 すフィードバックループの場合、E(s)=X(s)-A(s), Y(s)=G(s)E(s), A(s)=H(s)Y(s)となるので、

$$Y(s) = \frac{G(s)}{1 + G(s)H(s)}X(s) \tag{6-5}$$

となる。分母にある G(s)H(s)はフィードバックループに含まれる伝達関数の積(一巡伝達関数)、 分子の G(s)は前向きの伝達関数になっている。

# 6-2-2. フィードバック結合の安定性

ブロックをつなげた場合に、フィードバック結合のように出力を入力に戻す操作をするとシステム 全体が不安定になる場合がある。どのような場合に安定で、どのような場合に不安定になるのかを 知っておくことはフィードバック制御を実用する上で非常に重要である。前に述べたように伝達関 数はインパルス応答である。例えば、図 6-5 のフィードバック結合の全体の伝達関数は G(s)/(1+G(s)H(s))であるが、これはインパルス X(s)=1)を入力(したときの出力のラプラス変換で ある。インパルスを入力したときの出力の時間的振る舞いを調べるには、全体の伝達関数を逆ラプ ラス変換する。実際の計算では、1+G(s)H(s)=0 として*s*の根を求め、伝達関数を部分分数の和にし、 各分数を逆ラプラス変換すればよい。の根が実数の場合と虚数の場合があるであろう。従って、次 のようなラプラス変換をすることになる。

$$X(s) \xrightarrow{Y(s)} G_2(s) \xrightarrow{Z(s)}$$

図 6-3: 伝達関数の直列結合



図 6-4: 伝達関数の並列結合



図 6-5: フィードバック結合

$$\mathcal{L}^{-1}\left[\frac{1}{s+\sigma}\right] = e^{-\sigma t}, \quad \mathcal{L}^{-1}\left[\frac{\alpha s+\beta}{\left(s+\sigma\right)^2+\omega^2}\right] = Ae^{-\sigma t} \sin(\omega t+\varphi) \quad (6-6)$$

sの根の実部が負の場合(σ>0)には、上の解は時間無限大でゼロになる。しかし、根の実部が 正(σ<0)の場合には時間無限大で発散してしまう。つまり、フィードバック結合させたシステ ムは不安定になる。従って、フィードバック結合をもつシステムが安定か不安定かを判断するには 1+(一巡伝達関数)=0(特性方程式と呼ぶ)の根を調べればよいことが分かる。その他の判定法 も知られているが、特性方程式を解くことは Matematica などのソフトウェアを用いれば容易であ るので、他の判定法についてはここでは述べない。

# 6-2-3. 位相補償法

入力に対してシステムの応答が時間的に遅れるのはよくあることであるが、それは通常好ましくな いことが多い。遅れるだけでなく十分大きな出力が得られないのも問題であることが多い。遅れ系 は一般にローパスフィルターで近似される。例えば、後で述べるが、カンチレバーにレーザ光を照 射して光熱膨張によりカンチレバーを変位させることを考えよう。実際に測定してみると、カンチ レバーのレーザ光に対する変位応答は指数関数的であり、1次ローパスフィルターで十分に表され た。従って、この応答の伝達関数は G(s)=1/(1+s/ω<sub>0</sub>)\*M(s)と表される。ここで、M(s)はカンチレバ ー自身の力学的伝達関数で式(6-4)のような形になる。光熱膨張過程における遅れをできるだけなく す(補償する)にはどうしたらよいであろうか。レーザの駆動信号を操作して、あたかも光熱膨張 過程がないかのようにカンチレバーを振舞わせる。遅れの伝達関数が 1/(1+s/ω<sub>0</sub>)と表されてるので、 レーザ駆動信号 X(s)に(1+s/ω<sub>0</sub>)をかければよいことが分かるであろう。(1+s/ω<sub>0</sub>)は「1+微分」を 表しているので、「1+微分」回路をレーザ駆動信号の後に挿入すればよいであろう。「1+微分」 のボード線図は図 6-6 のように表される。



図 6-6: 「1+微分」のボード線図

このような位相補償法を「逆伝達関数位相補償法」と呼ぶ。大変簡単な方法で通常はこの方法はと ても有効である。しかし、微分のゲインは周波数に比例して大きくなるので、かなり高い周波数ま でゲインを大きくすることは実際の回路では難しい。例えば、光熱膨張過程がとても遅く、1kHz でゲインが半分になる場合、逆伝達関数位相補償法で100kHzまでゲインを下げないようにしよう とすると、微分のゲインは 100kHz で 100 倍ということになる。実際に微分回路を作ると、周波数の或るところからゲインが落ちていくので、このようなゲインの高い微分回路を作るのは不可能である。

1次ローパスの伝達関数は単純な形をしているが、位相補償しなければならないシステムの伝達関数は複雑な場合が多い。そのような場合に逆伝達関数を作成することが不可能になることもある。 そこで、我々は新しい補償法を開発した(図 6-7)。



図 6-7: 新しい逆伝達関数位相補償法

ここで、G(s)は補償されるべきシステムの伝達関数を回路で実現したもの、L(s)は回路に使用する アンプ系の遅れを現す。この回路系の伝達関数は

$$\frac{L_2(s)}{1+g[G(s)-1]L_1(s)L_2(s)}$$
(6-7)

と表される。もし、g=1, L<sub>1</sub>(s)=1, L<sub>2</sub>(s)=1 ならば、この伝達関数は G(s)の逆伝達関数 1/G(s)となる。 微分回路を用いていないので、アンプの帯域はかなり高くできる。一例として、G(s)が 10kHz の 1 次ローパスフィルターで、アンプの帯域が 8MHz だとしよう。生成される近似逆伝達関数に G(s) を作用させた結果のボード線図と元のボード線図の比較を図 6-7 に示す。



図 6-7: 10kHz のローパスフィルターのボード線図(上段)と新しい逆伝達関数位相補償 法で補償した結果(下段)の比較。

大幅に帯域が伸びていることが明瞭である。この補償法を複数段重ねていくことで更に帯域を延ば すことが可能である。

# 7. 高速 AFM

通常の AFM では水溶液中で動くタンパク質の映像を捉えるにはその走査速度は遅すぎる。AFM を高速化する必要性はずいぶん以前から言われていたが、それに取り組む研究室はほとんどなかった。2001 年に我々の研究室で1 画像を 80ms で撮れる高速 AFM が開発された。現在のところ世界 に1 台しかない装置であり、この教科書を読まれても利用できないのでは意味がないと思われるか もしれない。しかし、分子の動きを見たいという確かなニーズがあるので、必ずや数年後には世界 に普及しているものと予想される。ここで、我々の行った高速 AFM の開発の概略を述べる。

我々は当初 Constant Force モードを念頭に装置開発を進めていたが、高速走査では横方向のカ が大きくなり実用にならないことに気が付いた。それ故、Tapping モードにおける高速化を図った。 AFM の高速化実現のために、次の 6 つの要素の開発が必須であった。(1)共振周波数が高く、柔ら かいカンチレバー(極めて小さくなる)、(2)カンチレバーの振幅を高速に計測する装置、(3)極めて 小さいカンチレバーに使える光テコ光学系、(4)高速に走査しても振動しないスキャナー、(5)フィ ードバック帯域のセットポイント効果を減少させる動的 PID 制御法、(6)カンチレバー励振効率の ドリフト補償。これらを順に説明しよう。

# 7-1 高速走査用カンチレバー

式(3-1), (3-2)から明らかなように、高い共振周波数と小さ いバネ定数という特性は互いに相反する性質である。これら を両立させるためには、サイズを小さくするしかない。我々 は、長さ9  $\mu$ m、幅2 $\mu$ m、厚さ140 nmの窒化シリコン製 のレバーを作成した(図 7-1)。市販されているカンチレバ ーの 1/10 以下の大きさである。大気中共振周波数は約 1.5 MHz、水中共振周波数は約 600 kHz、バネ定数は約 200 pN/nm である。これらの数値は、カンチレバーの熱ゆらぎ のパワースペクトル解析より求めることができる。 共振周波数はパワースペクトルのピーク周波数であり、 バネ定数 $k_c$ は熱揺らぎの大きさの二乗平均(パワースペ クトルの積分) <  $x^2$  > を使って、

 $k_c = k_B T / \langle x^2 \rangle$  (7-1)



**図 7-1**: 高速走査用カンチレバーの 電子顕微鏡写真。(a) 長さ9 µm、 幅2 µm、厚さ 140 nm。探針は付 いていない。(b) EBD 法で付けた探 針。



図7-2: 最新の微小カンチレバー

と求められる。ここで $k_B$  とT はそれぞれ Boltzman 定数と絶対温度である。探針は、エッチングプロセスの難しさから、付いていない。電子線を1点に当ててコンタミネーションガスを重合させる EBD 法で形成させた。通常 1 $\mu$ m まで成長させる。探針先端の曲率半径は 5~9 nm である。2001 年のこのカンチレバーを更に改良し、現在のところ、水中共振周波数 1.2MHz、ばね定数約 200pN/nm の性能を得ている。長さは 7 $\mu$ m、幅 2 $\mu$ m、厚さ 90nm である。まだ十分の尖っていないが、探針は一体加工したものが付いている。そこに更に EBD 探針を形成し、プラズマエッチン

グ法で更に先鋭化している(図7-2)。

#### 7-2.高速振幅計測装置

カンチレバーの共振周波数を高くできても、その振動振幅を計測するのに時間がかかっては意味 がない。我々は、通常利用されている RMS-DC コンバーターに代わる新しい回路を開発した(図

7-3)。サイン波入力信号を2つに分けて、 片方の位相を90度遅らせ、その信号がゼ ロ点をクロスする時点でタイミング信号 を発生させる(入力サイン波信号のピーク とボトムのタイミングになる)。各タイミ ング信号を用いて、もう片方のサイン波信 号をSample&Hold 回路でホールドし、そ れらホールドされた電圧の差を振幅値と して出力する。これにより、1周期の時間 で振幅値を計測できる。高速に振幅を計測 できるばかりでなく、入力サイン波信号の 位相や周波数がずれても正確に振幅値を 計測できる。



# 7-3. 光テコ光学系

高速走査用カンチレバーの大きさは通常のカンチレバーに比べかなり小さい。小さいカンチレバ ーにレーザ光を絞って当てるためには焦点距離の短いレンズを使わなければならない。それ故、通 常の光テコ光学系のように反射光を外に導くことはできず、反射光を同じレンズで集めるしかない

(図7-4)。用いたレンズは長作動距離タイプの20倍の対 物レンズ(焦点距離10 mm)である。カンチレバーにお けるスポットサイズは回折限界の2~3µmである。入射光 と反射光は入/4 板と偏光ビームスプリッタにより分けて いる。斜めに設置されたカンチレバーにレーザ光を垂直に 当てるために、レーザ光をレンズの中心からわずかにずら した位置に入射する方式を採用した。この新しい光テコ光 学系では、反射光は対物レンズにより平行光に戻される。 カンチレバー先端の変位により、その平行光の位置が変化 するが、この変位の倍率はカンチレバーの長さと対物レン ズの焦点距離の比の2倍(すなわち、約2000倍)になる。





#### 7-4. 高速スキャナー

フィードバック制御ループにはほとんどの電子回路と機械デバイスであるスキャナーが含まれ ている。電子回路の帯域を広げることはそれほど難しくないが、機械デバイスのそれは極めて難し い。機械系の周波数帯域を広げることは、通常、その機械共振の周波数を上げることを意味する。 それはどうしてであろうか。機械系の共振周波数よりも低い周波数で機械系に力を加えた場合には、 その機械系は力に追随して変形する。しかし、機械系の 共振周波数と同じ周波数で力を加えると、機械系の動き は力に追随せず勝手に大きく振動してしまう。機械系の 共振周波数よりも高い周波数で力を加えた場合には、機 械系は力を加えても動かないか、動きにくくなってしま う。それ故、機械系を目的の速さで且つ目的とする量だ け正確に変形させるためには、機械系の共振周波数は動 作周波数よりも高くなければならないのである。共振と いうのは小さいエネルギーの注入で大きく振動する現象 であり、共振が一旦起こると制御不能になる。AFM はナ ノメータの精度が必要であり、スキャナーが共振するこ とは絶対に避けなければならない。それでは機械系の共

振周波数を上げるにはどうしたらよいのか。カンチレバーの共振周 波数の式(3-2)を見れば分かるように、軽く、コンパクトに、硬く すれば共振周波数は上がる。しかし、実際に使える材質や大きさを 考えると、30 kHz 以上の共振周波数をもつマクロな機械デバイス を作成することは不可能に近い。市販 AFM 装置に使われている円 筒型ピエゾスキャナーの共振周波数が1 kHz 程度しかないことを 考えても、この困難さを理解できるであろう。ピエゾ素子そのもの については、共振周波数が 300kHz 程度のものを作ることは可能で ある。しかし、それを3次元に組み上げた構造自身の共振周波数は 低くなってしまう。更にもうひとつの困難が存在する。高い周波数 でピエゾを動かすと大きな撃力(反力)が生ずる。その大きな撃力 がピエゾ支持部に働いても1 nm 以下の変位しか起こらないような

高い剛性を実現することも難しい。高速 AFM が長い間実現されてこなかったのも、まさに以上の 困難のためなのである。マクロな機械デバイスでは不可能ならば、ミクロな機械デバイスで実現す ることもひとつの方向である。カンチレバー自身にピエゾ機能をもたせ、Z方向のフィードバック 制御を行うことも可能である。実際 Quate らはそのようなカンチレバーを製作し、30 kHz 以上の 帯域を持たせることに成功している。しかし、カンチレバーを絶縁せねばならず、カンチレバーの バネ定数は極めて大きくなってしまう。我々は試行錯誤ののち、以下のように発想を転換した。(a) 共振周波数は低くとも共振振幅を小さくする。(b)ピエゾ素子の急激な伸縮で発生する撃力を打ち消 す。この発想に基づき図7-5 に示す高速スキャナーを開発した。使用したピエゾ素子はすべて同じ 積層タイプで、自己共振周波数 260 kHz、最大変位 4.5 μm、大きさは 2.7x4x5 mm<sup>3</sup>である。スキ ャナーは2層構造をしており、1層はY走査、2層目はX走査、Z走査を行う。この層構造により XYZ間の干渉は小さい。Zスキャナーは対向する2つのZピエゾ素子をもつ(図7-6)。試料ステ ージはこれらの内のひとつのZピエゾ素子に真空グリースを介して取り付けられる。もうひとつの Zピエゾには試料ステージの質量と等しいダミーステージを取り付けている。これら対向するZピ エゾを同じ距離だけ反対向きに同時に変位させる。これにより、生ずる撃力をかなり打ち消すこと ができる。ZピエゾとXピエゾが接着されているベース(Base-2)は2つの平面 (Base-1 と Plate-2)



図 7-5: 高速スキャナーの構造



図 7-6:カウンターバランス

によって、鉄製ボールベアリング(直径 1 mm)を介して、Z方向にきつくクランプされている。 このデザインは、Base-2 のX方向の滑らかな変位を可能にし、かつ、Z方向の振動を極力抑える ことを可能にする。Yピエゾが接着されているベース(Base-1)も2つの平面(Plate-0 と Plate-2) によって鉄製ボールベアリングを介して、Z方向にきつくクランプされている。このZスキャナー は約 60kHz まで安定に動作する。

2001 年に開発した高速スキャナーでもまだ十分な性能ではない。ボールスライド方式は締め付ける力を相当強くする必要があり、そのためにベースの金属が変形して、その結果×方向の走査に

より Z 方向に若干振動する。そこで、板ばね 方式の構造を試みた(図 7-7)。また、Zス キャナーの共振周波数を更に上げるために もっと小型のピエゾ素子に置き換えた。これ らの改良により、X 走査の帯域(Z 方向に振 動しない走査周波数)は 50kHz まで伸び、 また Z 方向の共振周波数は 150kHz まで伸 びた(図 7-8)。

# 7-5. 高速スキャナーのアクテチィブダンピング

しかしながら、共振のQ値は18程度と大きく、 その結果応答速度は遅い。Q値制御によるアクテ ィブダンピングにより、この共振のQ値を下げ るためには、Zスキャナーの変位をモニターする 必要があるが、高速且つ小さい変位をモニターす ることは大変難しい。そこで、新しい方法を考案 した。Zスキャナーの変位を直接モニターしなく ても、Zスキャナーと同じ伝達関数G(s)をもつ 電気回路を擬似Zスキャナーとし、ピエゾ電源に 供給する信号をこの擬似スキャナーに入力し、そ の応答信号でQ値制御を行う。その構成を図7-9 に示す。



図 7-7: 板ばね方式の高速スキャナーの構造



図 7-8: 高速Zスキャナーの共振スペクトル。 赤い線はアクテチィブダンピング前、青い線は アクテチィブダンピング後。



図 7-9: 新しいアクテチィブダンピング制御法の構成 28

図 7-8 の青い線で示すように、共振を完全になくすことに成功した。Q 値は 0.5 まで減少し、その 結果応答速度は 36 倍増大し、応答時間を 1.1 µs にまで短くなった。

# 7-6. 動的 PID 制御法(探針・試料間にかかる力の軽減化)

アクチンフィラメント上を運動しているミオシンVやマイクロチュービュル上を運動している キネーシンを撮影する試みを 2001 年に我々は開始した。このイメージングにより、Tapping 走査 モードが致命的な問題を抱えていることに気が付いた。図 7-10 にファッシンで束化されたアクチ ンフィラメントの像を示す。アクチンフィラメントもマイクロチュービュルも撮影中にどんどん破 壊されていった。200 pN/nm のバネ定数をもつカンチレバーの最大振幅を peak-to-peak で 5 nm、 目標値を 4.5 nm 程度に設定している。この条件では式(11)に基づく解析から、探針・試料間に平 均で 430 pN/Q(~2)の力が働いていることになる。これは高速走査とは別の問題であるが、同一の 領域を何回もイメージングすると、試料のダメージが目立つようになる。カンチレバーの最大振幅 をこれ以上小さくすると画像の質が悪くなる。目標値を 4.5 nm よりも大きくすると、パラシュー ティングが起こり、像が得られなくなる。探針・試料間に大きな力が働くことは最も切迫した問題 であり、この解決に向けて我々は様々な試みを行った。



図 7-10: バッファー溶液中でマイカに吸着させたアクチン束の AFM 映像。アクチンフィラ メントはファッシンで束化している。正電荷をもつアビジンを介してアクチン束をマイカに 吸着させた。走査範囲は 600x600 nm<sup>2</sup>、ピクセル数 100x100、フレームレート 2.8/s。連続 して撮った 100 フレームから 10 フレーム間隔で抜き出した像を並べた。

5.2節で説明したように、セットポイントをカン チレバーの自由振動振幅に近づけていくと、パラ シューティングが起こり、その結果フィードバッ ク帯域が減少する。その原因は、飽和エラー信号 が小さくなるためである。エラー信号が小さくな るのであれば、PID制御のゲインを大きくすれば よいはずだが、パラシューティイングが起こって いない領域(特に試料の昇り勾配)でゲインを大 きくすると、昇り勾配が小さくなるところ(試料 の頂上付近)でオーバーシュートする。オーバー シュートによりパラシューティイングが一層起 こるようになり、オーバーシュートとパラシュー ティングが同時に起こり、フィードバック制御は 極めて不安定になり像が得られなくなる。この問 題の本質は PID 制御においてゲインパラメータ



図 7-11: 動的 PID 制御の原理とそれを実現する回路のブロック図。

が常に一定にあることにある。そこで、探針・試料間相 互作用の強さに応じてゲインパラメータを自動的に変 更すれば、この問題は解決されるはずであると着想した。 探針・試料間相互作用の強さはエラー信号の正負で大ま かに表すことができる。エラー信号はカンチレバーの振 幅(Peak-to-peak)とエラー信号の差、すなわち、(A-A<sub>s</sub>)であり、これが負の場合は探針・試料間相互作用が 強すぎ、正の場合は弱すぎると判断することができる。 そこで、図 7-11 に示すように、セットポイントと自由 振動振幅の間に閾値を設け、カンチレバーの振幅がその

閾値を越えた場合に、真のエラー信号に偽のエラ ー信号を加えて、フィードバックゲインを大きく する。そのフィードバックにより、振幅が閾値以 下に戻れば偽のエラー信号をゼロにする。セット ポイントよりも小さいところにも閾値を設け、こ の閾値よりも振幅が小さくなった場合にも偽のエ ラー信号を加えることもできる。但し、セットポ イントよりも下側ではエラー信号はめったに飽和 することはないので、この効果はないか、或いは、 オーバーシュートを引き起こすので、通常は使わ ない。ここで開発した動的 PID 制御法は極めて有 効な方法である。その有効性を以下に示そう。図 7-12 に、制御回路を別にして、同じ試料を同じ条



図 7-12: 動的 PID 制御法の効果。左 の像は通常の PID 制御を用いた場 合、右の像は動的 PID 制御法を用い た場合。高さが異なる矩形計上の試 料をイメージングした。



図 7-13:フィードバック帯域のセットポイン ト依存性における動的 PID 制御法の効果。実 線が通常の PID 制御の場合、破線が動的 PID 制御法を用いた場合。

件で撮った像をす。通常の PID 制御では、パラシューテチィングが著しく起こり、試料の矩形形状 を解像できていない。それに対して、動的 PID 制御を用いた場合には、パラシューティングは起こ らず、高解像が得られている。次に、フィードバック帯域のセットポイント依存性がどれくらい改 善されるかを図 7-13 に示そう。セットポイントを自由振動振幅にかなり近づけてもパラシューテ ィングが起こらず、その結果フィードバック帯域はセットポイントにほとんど依存しない。従って、 探針が試料を押し付けずに高速にイメージングできるようになった。

# 7-7. カンチレバーの励振効率のドリフト補償

装置にはドリフトは付物である。ナノ精度を要する AFM においてドリフトは厄介であるが、走査 モードやイメージング速度によってその影響のされ方は異なる。走査速度が遅いとドリフトの影響 が大きいのは当然である。例えば、試料ステージの位置がドリフトによって移動してしまう場合、 走査速度が遅いとそのドリフトは試料の凹凸とみなされ、画像にそのまま表れる。光てこ法におけ る分割フォトダイオードの位置のドリフトは、DC 走査モードでは試料の凹凸に直接反映されてし まうが、タッピングモードではカンチレバーのたわみではなく振幅を計測するので、このドリフト の影響を受けない。総じて、タッピングモードはドリフトに強いと言える。ところで、動的 PID 制 御法によりセットポインントをカンチレバーの自由振動振幅にかなり近づけてもパラシューティ ングを起こりにくくすることができるようになったが、セットポイントと自由振動振幅の差は極め て小さい。例えば、自由振動振幅を 2.5nm、セットポインントを peak-to-peak 振幅の 0.95 と (4.75nm) すると、その差はわずかに 0.25nm しかない。例えば、カンチレバーの励振効率がドリ フトにより小さくなると、自由振動振幅は減少するが、AFM 装置はこの減少を「カンチレバーに 試料に強く接触しているために振幅が減少した」とみなす。従って、フィードバック制御により試 料ステージはカンチレバーから遠ざけられる。自由振動振幅が減少したにもかかわらず、遠ざけら れるとカンチレバー探針は試料から完全に離れてしまう。従って、カンチレバーの励振効率のドリ フトは最も厄介なドリフトであると言える。このドリフトの原因として、励振用ピエゾの発熱や、 溶液が周りの容器などに接する面積の変化などが考えられるが、それらを制御することは極めて難 しい。更に、イメージング中にカンチレバーの自由振動振幅を計測することはできない。カンチレ バーの自由振動振幅が減少しても、それが探針と試料が強く接触し過ぎていることで起こっている のではないことを AFM 装置に判断させるにはどうしたらよいであろうか。カンチレバーは励振信 号の周波数で振動しているが、探針・試料間の相互作用によりその波形はゆがむ。従って、カンチ レバーの第一次振動モードの共振周波数の他に高次の周波数にも成分をもつようになるはずであ る。そこで、カンチレバーの振動のパワースペクトルを測定した(図7-14)。極めて小さいけれど も、第一次の共振周波数の整数倍の周波数に振動が観察された。



図 7-14: 第一次共振周波数で励振されているカンチレバー振動するカンチレバー(水中)をマ イカに接触させ、振幅が 90%に減少したときの振動の周波数成分。

そこで、2 倍波の周波数成分の振幅をモニターし、それが走査中に一定になるように励振用ピエゾ のドライバー(波形発生器)の出力を大きな時定数をもつ積分回路で制御を行った(図 7-15)。そ の効果を図 7-16 に示す。溶液中のアクチン・ミオシン V 複合体を 80ms/frame の速度、セットポ イント 0.95 で 3 分間イメージングを続けた。赤い線で示す積分制御回路の出力からも明らかなよ うに、励振効率が減少し続けていることが分かる。それに対して、青い線で示す 2 倍波成分の振幅 は一定に保たれており、安定なイメージングができている。3 分間イメージングしたあとに制御を 止めると、真っ黒な画像が得られ、カンチレバーが試料表面から完全に離れてしまった。即ち、試 料表面から完全に解離してしまうほどカンチレバーの励振動効率が減少していた。



図 7-15: カンチレバーの励振効率のドリフト補償のブロックダイアグラム



図7-16: カンチレバーの励振効率のドリフト補償の効果。

上記の他に、高速センサーアンプ、XY走査信号発生回路、高速ピエゾドライブ電源などを開発した。開発したデバイスを組み上げて、図7-17に示す高速 AFM を製作した。生物試料観察の色々な応用を考慮して、倒立型蛍光顕微鏡と高速 AFM を一体にしている。倒立型蛍光顕微鏡の対物レンズにより半導体レーザー光を絞りカンチレバーからの反射光を集めるが、この対物レンズを通してカンチレバーへの半導体レーザーの照射位置観察・調節を行うことができる。光学顕微鏡はサイズが大きくその共振周波数は低い。それ故、それは周りの音や台からの振動の影響で絶えず大きく振動している。電子回路を除く AFM のすべてのデバイスは光学顕微鏡の試料ステージ1枚(通常のステージを厚いステンレス板で置き換えた)の上に載るか、吊るされており、各デバイス間の相対的な位置はこの振動の影響を受けない構造になっている。



図 7-17: 開発した高速 AFM 装置の写真。(左) AFM ヘッド部。倒立型光学顕微鏡の 上に搭載されている。(右)制御系などのエレクトロニクス部。

# 8. 初期のイメージング

# 8-1. 通常の撮影速度での動態イメージング

AFM が発明されてから 16 年の間に多くの生物試料の観察が行われてきた。AFM が生物試料に ・適用され始めた当初は、この新しい顕微鏡の可能性を探るべく色々な試みが活発に行われた。特に 注目すべきは、生物試料のバッファー溶液中でのダイナミックな振る舞いを観察しようという試み が直ぐに開始されたことである。1989年に Hansma のグループは、血液凝固因子であるフィブリ ノーゲンをトロンビンで切断してフィブリンを生成し、それが凝固していく様子を約1分間隔で撮 影した。次の年には、IgG がマイカ表面に吸着していく様子を 2.5 分おきに観察している。IgG が 共同的に集合体を形成する様子が観察された。 走査速度は十分とは言えず観察対象が動いているの で像は鮮明ではない。AFM の発明者である Binnig 自身も生物現象の映像を撮ることに興味があっ たようで、腎臓から単離した細胞が pox ウィルスに感染される様子を 48 時間にわたって観察して いる。ウィルス添加後1分で細胞は極めて柔らかくなり、探針が細胞を貫くのを必ずしも避けるこ とができなかったと述べている。数分後になると細胞はもとの硬さにもどり、2 時間後には細胞膜 のいくつかの場所から 10-100 nm の小塊が出てきては消える様子が観察された。感染後 6 時間ほ どすると、増殖したウィルスが細胞の外に飛び出す様子を分刻みの映像として捉えている。しかし その後しばらくの間ダイナミクス観察は行われなかった。Bustamante と Hansma らは、DNA のマ イカ表面での拡散運動、DNase による消化過程、DNA に RNA polymerase (RNAP) が結合する過 程の連続イメージングを1994年に試みている。基板に緩くしか吸着していないゆっくり動いてい る分子でも Tapping モードでイメージングできるようになったことが、ダイナミクス観察が再開 された大きな要因となっている。未だイメージングに1分前後の時間がかかっているため、運動し ている分子はかなりぼやけて見える。彼らはこの研究を継続し、1997 年には RNAP が DNA を転 写する様子を約 30 秒間隔で観察した。RNAP はマイカ表面に吸着し、それに結合した DNA はマ イカ表面に緩くしか吸着していない。4種の NTP の添加後、RNAP に結合した DNA の片側が時間 とともに短くなり、最後には RNAP から解離する様子が観察された。終止配列で止まらずに、そ

のまま DNA の末端まで配列を読んでいるように観察された。合成された RNA 鎖は試料を乾燥させない系では見えていない。 1999 年には、RNAP が DNA 鎖に沿って一次元拡散運動する様子を観察している。フレーム間隔は 30~60 秒である。同じ年に、Lin らは Collagen 分子が collagenase と結合し分解されていく様子を4分間隔で連続イメージングしている。 2000 年に Oberleithner らは、 核膜孔が 5%CO2 に曝されると数分で閉じていくことを観察している。

数ある AFM イメージングの報告の中でダイナミクス観察の報告は上述のように極めて少ない。 それは、AFM の撮影速度が遅く、その遅い速度で捉えることのできる分子過程が僅かにしかない ためである。また、観察された映像もほとんどの場合鮮明とは言いがたい。数多くの AFM によっ て撮影された静止像は電子顕微鏡像が与える情報よりも豊富な情報を与えているわけでは必ずし もない。AFM の最大の長所である「バッファー溶液中に在る活性をもつ生物試料がナノ解像度で 見える」という特徴は高速 AFM によって初めて活かされると言えるのである。

#### 8-2. 高速 AFM による初期の動態イメージング

例は少ないが、2001年に開発された高速 AFM でイメージングされた映像を紹介しよう。ひよこ 脳から精製したミオシンVは筋肉に代表されるミオシンのファミリーに属するが、神経細胞のなか で物質輸送に関っている。N端にある2つの球状頭部に続く2つのネック領域は長く、それぞれ6 つの IQ モチーフをもち、カルモジュリンと他の軽鎖が結合している。ネック領域から先はほとん ど1本にまとまり Coiled-coil の長い尾部となり、2つの球状ドメインで終わる。この球状ドメイン には輸送されるカーゴが結合すると考えられている。ミオシンVは筋肉のミオシンと違い重合せず 単量体で存在する。輸送モータであることからも予想されるように、ミオシンVは一旦アクチンフ ィラメントに結合するとなかなか解離せず、アクチンフィラメントに沿って長い距離運動する。

図 8-1: バッファー溶液中でマイカ表面に直接吸着させたミオシンVの AFM 映像(1)。走査 範囲 270x270 nm<sup>2</sup>、ピクセル数 100x100、フレームレート 12.5/s(80 ms/フレーム)。20 フ レーム(1.6 秒間)撮ったうちの連続した一部を示している。ミオシンVの典型的な Y 字型 形状が明瞭である。

それ故、機能動態を観察するに適した分子モータである。私の研究室では、ミオシンVがアクチン フィラメントに沿って運動する様子をナノ解像度の映像として捉えることを目指している。我々は まずマイカ表面に吸着したミオシンVの映像を捉えることから始めた。図 8-1 は初めて捉えた溶液 中で動くミオシンVの像を示している。走査範囲は 270 nm で、100x100 ピクセルから成る。撮影 速度は 12.5 フレーム/s で、20 フレーム連続に撮影した。2 つある頭部のうち片方でマイカに吸着 しており、それ以外の部分は吸着しておらず激しくブラウン運動している。Y字形の頭部・ネック 領域と長い尾部が見える。未だノイズが多く、各フレームの像を並べたパネルでは判りにくいが、 動画では運動の様子がはっきりと分かる(http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys.index.htm で見ることができる)。長い尾部の運動はかなり速く、1 フレーム当たり 80ms の撮影速度でも若 干ブレて見える。この試料には ATP は含まれていない。次に ATP を加えたときの映像を図 8-2 に 示す。50 フレーム連続に撮った一部である。最初水平に近い位置にあった長い尾部が 3 フレーム



図 8-2: バッファー溶液中でマイカ表面に直接吸着させたミオシンVの AFM 映像(2)。バ ッファー溶液中には 2 mM ATP が含まれている。走査範囲 270x270 nm<sup>2</sup>、ピクセル数 100x100、フレームレート 12.5/s(80 ms/フレーム)。50 フレーム(4 秒間)撮ったうち の連続した一部を示している。長い尾部の運動に着目されたい。

目には急に垂直に近い位置に移動している。この移動するまでにかかった時間は 30 ms 以下と見積 もられる。それに対して、尾部が垂直に近い位置に移動したあとは激しくブラウン運動しているも のの、垂直に近い位置を長い時間維持している。従って、水平に近い位置から垂直に近い位置への 速い変化はブラウン運動では説明できず、何らかの力が尾部の付け根(尾部と頭部・ネック領域の 境界)付近に働いて運動が起こったと思われる。ミオシンV単独での ATPase 活性は低く、20 秒 に1回程度しか反応は起こらない。それ故、4 秒の撮影時間の間ではせいぜい1回の反応しか起こ らず、尾部の位置の急激な変化を繰り返し捉えることは難しい。従って、観察された尾部の水平位 置から垂直位置への変化が本当にATPase 反応とカップルしているかどうかは現在の所断定できな い。図 8-3 にミオシンVの頭部・ネック領域の互いの相対的位置が変化する様子を示す。頭部、ネ ック領域とも剛体に近く、それぞれは大きく形態を変えないが、頭部とネック領域の接続部がヒン ジになっているように振舞う。



図 8-3: バッファー溶液中でマイカ表面に直接吸着させたミオシンVの AFM 映像(3)。ピクセル 数 100x100、フレームレート 12.5/s (80 ms/フレーム)。走査した範囲は 240x240 nm<sup>2</sup> であるが、 その一部の領域(150x150 nm<sup>2</sup>)を切り出して拡大した。100 フレーム(8 秒間)撮ったうちの 連続した一部を示している。Y 字型の頭部・頚部の形態変化に注目されたい。

上記の高速 AFM によるタンパク質の最初の動画像撮影の経験から、我々はいくつかの問題に気 が付いた。当たり前のことではあるが、AFM 撮影では或る一定の方向からしか試料を見ることが できない。試料に構造形態変化が起こっても、それを見やすい方向があり、見にくい方向から見て いる場合もある。それ故、多くの個々のタンパク質分子を観察する必要がある。また、観察時間内 に繰り返し構造形態変化が現れる場合は別だが、そうでない場合には新たな工夫が必要である。ま た、生理機能に関る構造形態変化とブラウン運動を区別できる必要もある。更に、試料が基板にし っかり吸着した場合には構造形態変化は抑制されるであろうから、試料の(できれば機能にとって 重要でない)局所でのみ試料が基板に吸着している必要がある。これらの問題に対する対処につい ては後述する。

#### 9. 最新の高速 AFM による動態イメージング

2001年の第一世代高速 AFM 以降、色々な改良が加えられた。その結果、探針が試料にわずかしか 接触しない状態でも高速イメージングが可能になり、いくつかのタンパク質の機能動態の撮影に成 功している。それでも尚、高速 AFM 装置の性能は十分とは言いがたく、次世代の高速 AFM の開発 を現在でも継続して行っている。その内容は次の章に譲り、ここでは、これまで捉えることのでき たタンパク質の機能動態などの例をいくつか紹介しよう。

# 9-1. アクチンフィラメントの滑り運動

2001年の第一世代の高速 AFM が完成後、我々は基板に固定されたミオシンVの上をアクチンフィ ラメントが動く様子を観察することに挑戦した。基板はミオシンVでぎっしり敷き詰められている が、アクチンフィラメントが観察範囲に見当たらない。アクチンフィラメントの濃度を上げてもま ったく見えない。この理由がはっきりしないまま時間が経ったが、その原因は、走査中に探針によ りアクチンフィラメントが掃かれてしまうためであることが分かった。また、アクチンフィラメン トが観察される場合でも、アクチンフィラメントはイメージングに徐々に壊れていった。アクチン フィラメントは G-アクチンが非共有結合(主に疎水性結合)でつながったものであり、その結合 に働く力は 100pN 程度であると見積もられている。第2世代高速AFMを開発し、その性能が第 一世代のものに比べどのくらい性能が上がっているかを確認するために、再びミオシンVの上をア クチンフィラメントが動く様子の観察を試みた。図 9-1a に示すように、アクチンフィラメントは 壊れることなく、基板の上を一方向に向かって動いていった。この運動速度は蛍光顕微鏡で測定し た値とほぼ一致した。このことから、振動するカンチレバー探針がアクチンフィラメントやミオシ ンVの生理機能を乱さないことが明らかになった。



図 9-1: 第2世代高速 AFM が捉えたタンパク質のナノ動態の例。(a)ミオシ ンVがコートされた基板の上をすべり運動するアクチンフィラメント。(b) アクチンフィラメントのすべり運動を起こしているミオシンV。(c)ATP 分 解中のダイニンC。(d)基板にコートされた GroEL に結合していく GroES。
次に、基板をコートするミオシンVの濃度を下げて、個々のミオシンVが観察できるようにしてア クチンフィラメントが動くときのミオシンVの動態を捉えた(図9-1b)。アクチンが動く瞬間に結 合しているミオシンV頭部に大きな構造変化があるかどうかだが、はっきりした変化は観察されな かった。但し、結合している頭部はアクチンフィラメントに対して一方向を指差すように配向し、 これは良く知られている「矢じり構造」に対応する。指差す方向がアクチンフィラメントのP端(或 いはマイナス端と呼ばれる)であるが、アクチンフィラメントはマイナス端に向かって動いていた。 これはそうあるべき方向であった。

## 9-2. ダイニン C

ダイニンは AAA タンパク質ファミリーに属し、リング状のヘッド 部をもつモータタンパク質である。微小管と相互作用して力を発 生する。鞭毛軸糸に存在するものと、細胞質に存在するものが知 られている。ダイニンCはクラミドモナスと呼ばれる原生動物の 鞭毛に存在するダイニンの一種で単頭構造をもち、リングからス



図 9-2: ダイニンCの電顕写真

テムとストークが突き出ている。リングには ATP 加水分解の活性中心が存在する。ストークはコ イルド・コイルの細長い部分の先に球状のドメインがあり、この球状のドメインで微小管と相互作 用する。ステムは軸糸の中でダイニン C を固定する部分であると考えられている。ダイニンCのモ ータ活動のメカニズムは未だよく分かっていないが、電顕観察から、ステム・ストーク間の角度が ヌクレオチドがないとき(Apo 状態)と ADP・Vi が存在するときで異なることが報告されている。 Apo 状態では 136 度、ADP・Vi 状態では 160 度である。ADP・Vi は ATP 分解中に生ずる ADP・ Vi を模擬するものと考えられており、この結合状態の寿命は長い。まず、この報告された角度の違 いを AFM で確認したところ、ほぼ報告と同様の結果を得た。次に、ATP 分解中のダイニンCを観 察したところ、ステムがカタカタと向きを変え、2 つの位置の間を行ったり来たりする様子が観察 された(図 9-1c)。このときのステム・ストーク間の角度は 2 つにはっきり分かれており、小さい 方の角度は Apo 状態の角度に一致していた。大きい方の角度は ADP・Vi 結合状態よりも若干大き かった。また、角度が変化する頻度は ATPase のターンオーバーレートにほぼ一致していた。これ は、観察されたステムの運動が ATP 加水分解によって駆動されていることを明示している。

# 9-3. GroEL-GroES の結合(1)

GroEL は大腸菌にあるシャペロニンであり、菌内で合成されたポリペプチドが正しい3次構造に折 れたたまるのを支援するタンパク質である。7個のサブユニットでリングを形成し、2つのリング が背中合わせに結合している。リングの中央は空孔になっており、そこに基質であるポリペプチド が入り込む。GroEL を基板にまくと、リングの上面でマイカに結合するため、AFM で観察すると 中央に穴が見える。GroES はコシャペロニンであり、GroEL がヌクレオチドを結合しているとリ ングの上面、或いは、下面に結合し、穴にふたをする。GroES の GroEL への結合のヌクレオチド 依存性を使って、ケージド ATP の紫外線による解除と高速 AFM 観察を組み合わせる手法の有効性 を示す実験を行った。GroEL をマイカ表面にぎっしり吸着させておき、GroES を Caged-ATP を含 む液中に浮遊させておく。そこに紫外線パルスを照射する。照射後に速やかに GroES が GroEL に 結合する様子が観察された(図 9-1d)。

#### 9-4. 脂質平面二重層膜の形成過程

これまでの観察ではマイカを基板として用いて、そこにタンパク質分子を吸着させていた。マイカ は原子レベルで平滑で便利ではあるが、非特異的な吸着(マイカは負に帯電しており、主に静電相 互作用で吸着)を利用しているため、タンパク質の固定箇所や向きを制御できない。そこで、タン パク質の特異的な箇所で基板に固定するために色々な試みを行ってきた。脂質の LB 膜はこの目的 に良く利用されている。色々な官能基をもつ脂質が市販されており、特異的な吸着を実現できる。 しかし、LB 膜の作成にはかなり時間と熟練を要する。そこで、脂質ベシクルを基板に撒いて自然 に開かせて平面二重層膜を形成させることを行った。その実験において、二価金属イオン存在下で 脂質がナノチューブを形成することを見出した。そこで、このナノチューブの形成過程及び平面二 重層膜の形成過程の観察を行った。図 9-3 にその一例を示す。まず、カルシウムフリーの状態でベ シクルを調製し、観察直前にカルシウムを加え、カルシウムフリーの溶液で満たされた観察セル中 に挿入した。従って、この観察ではイメージング中にカルシウム濃度は徐々に下がっていく。挿入 後直ぐに、小さいパッチ状の平面二重層膜と短いナノチューブが観察された。時間とともに平面二 重層膜とナノチューブは大きくなっていった。この過程で、ナノチューブ同士の先端での融合やナ ノチューブの先端と平面二重層膜との結合が観察された。後者では、脂質が平面二重層膜からナノ チューブに移動するようで、平面二重層膜が小さくなっていく様子が観察された。時間が経つにつ れて、ナンチューブの密度が増していき、かなり高密度になったところで一瞬にナノチューブが壊 れてすべて平面膜になる様子が観察された。



図 9-3: 脂質ベシクル・ナノチューブからの平面二重層膜の形成過程。イメージング 速度 1s/frame, 走査範囲 800nm で 30 分間撮影。各フレームの数字はフレーム番号。

## 9-5. アクチンフィラメントに沿ったミオシンVの運動

ミオシンVは部分的に静電荷が多くマイカに吸着しやすく、逆にアクチンフィラメントはマイナス 電荷が多くマイカに吸着しにくい。従って、固定されたアクチンフィラメントの上をミオシンVが 運動する様子を観察することは難しい。そこでまず、ミオシンVを消化酵素を用いて処理して尾部 を除去した。そしてイオン強度を上げて基板に吸着しにくくした。アクチンフィラメントは複数の ミオシンVに結合するため、或る程度基板に留まっている。ATP存在下では、ミオシンVの頭部と アクチンとの結合は極めて弱いため、それを乱さずに個々のミオシンVの運動を観察することは極 めて難しい。そこで画質は落ちるけれども、セットポイントをカンチレバーの自由振動振幅にかな り近づけてある程度のパラシューティングが起こるのを覚悟で観察を行った。図9-4にその観察例 を示す。図9-4の静止画では分かりにくいが、両方の頭部がアクチンフィラメントに結合し、その 後片方の頭部がアクチンフィラメントから解離する。結合したままの頭部は「矢じり構造」を示し た。解離した頭部は結合している頭部の更に先まで移動し、アクチンフィラメント上の結合相手を 探しているように見える。矢じり構造から、解離した頭部は「後ろ足」で、結合したままの頭部は



図 9-4: アクチンフィラメントの上を一方向に運動するミオシンVの像。イメージング速度は 100ms/frame。



図 9-5: Hand-over-hand 様式の運動のメカニズム。Apo 及び ADP 結合状態では頭部ネックに対して真っ直ぐになっている。そのため「1」の場合には、前足はアクチンに結合できない。「2」: 前足に ATP が結合するか、結合した ATP が分解されると頭部・頚部間は屈曲し、その結果前 足もアクチンに結合できるようになる。「3」: Pi が解離すると ADP 状態になり、頭部は頚部 に対して真っ直ぐになろうとする。しかし、ADP 状態では頭部のアクチンへの親和性が高く結 合したままである。従って、無理やり結合しているため、ストレスが生ずる。このストレスに より前足の頚部は曲がり、後ろ足が前方に引っ張られる。その結果、後ろ足から ADP が解離 しやすくなり、「4」: ADP が解離し、その結果後ろ足はアクチンから解離し、前方に移動し「1」 の様態に戻る。

「前足」であると判断される。走査範囲が狭いので、移動していくミオシンVを追跡していくこと は今のところ難しい。いずれにしてもここで観察された振る舞いはいわゆる「Hand-over-hand」モ デルとよく一致する。高速 AFM 観察と生化学的データなどから、図 9-5 に示すような一連の変化 により Hand-over-hand 運動が起こっているものと推測される。

## 9-6. GroEL-GroES の結合(2)

GroEL のダブルリングは一連の反応が繰り返し起こる のに必要である。単一リングでもポリペプチドが折りたた むのを支援する能力はあるが、反応は1回で止まってしま う。もう片方のリングに ATP が結合しない限り、結合し た GroES は GroEL から解離しない(しづらい)。また、 GroES の GroEL の結合(或いは ATP の GroEL への結合) は2つのリングで同時には起こらず、反共同的に制御され ているらしい。ところで、GroEL はリング上面でマイカに

吸着するため、片方の穴がマイカで ブロックされてしまう。従って、こ の反共同性や、一連の反応の繰り返 し観察を行うことができない。観察 を行うためには、GroEL をその側 面で基板に固定する必要がある。こ れを可能にするには、2つの条件を 整える必要がある。(1)特異的な官 能基を GroEL の側面に導入する。 (2)その特異的な官能基に選択的に

GroEL-D490C

図 9-7: GroEL D490C 変異 体と基板固定の模式図。

図 9-6: Streptavidin の 2 次元結晶の

AFM 像。256nmx183nm。



300nmx300nm。

結合するものを基板に平滑に敷き詰める。特異的、且つ、強固な結 合として Avidin (4量体)と Biotin との結合が良く利用される。そ

こで、(1)の条件を、GroEL の側面に Cys を遺伝子工学的に導入し、それに SH 反応基をもつ Biotin-maleimide と反応させることで満たし、(2)の条件を、Biotin をもつ脂質の平面二重層膜の上 に Streptavidin を敷き詰めることで満たすようにした。 図 9-6 に示すように、凹凸の少ない Streptavidin の二次元結晶を作成することができた。また、490番目の Asp を Cys に置換した変異 体を大腸菌で発現することができた。以上により、GroEL を基板に横倒しで固定できるようになっ た(図 9-7、図 9-8)。横倒しになっている結果、穴が見えていない。またおおよそ四角形に見える。 次に、横倒しで基板に固定した GroEL の試料に GroES と ATP を加えて、反共同的に GroES が



図 9-9: GroES の GroEL への反共同的な結合様式を示す AFM 映像。150nmx150nm, 0.97s/frame。 数字はフレーム番号。弾丸の尖った部分が左・右と変化している。

GroELに結合するかどうかを観察した。確かに2つのリングに同時に結合している GroES はなく、 どちらか片方のリングだけに結合する。その結果、弾丸のような格好に見える。未だ観察例が少な く断定できる段階ではないが、図 9-9 に示すように反共同性を示す結果を得ている。

#### 10.次世代高速 AFM に向けた開発

2001年に第一世代、2005年に第二世代の高速 AFM を完成させたが、未だイメージング速度、 解像度、探針・試料間に働く力の軽減化が十分とは言えない。これらの更なる改善を目指して現在 様々な試みを行っている。そのいくつかの開発状況と得られている成果について以下に説明する。

#### 10-1. 光・熱膨張効果を利用したカンチレバーの励振と変位駆動

これまではカンチレバーの励振はピエゾによる音響励振を利用してきた。簡便な方法であるが、 水や周りの金属などを介して振動がカンチレバーに伝わるので、カンチレバー以外のものも振動し、 その振動スペクトルは複雑である(Forest of Peaks と呼ばれる)。従って、ピエゾを振動させる信 号とカンチレバーの振動との位相関係も複雑であり、位相情報を抽出したり、カンチレバーの振動 のQ値を制御することが難しい(Q値を大きくする制御はそれほどでもないが、Q値を小さくす る制御は非常に難しい)。水中では微小カンチレバーのQ値は2-3とそれほど大きくないが、高速 応答性を与えるにはQ値を0.7程度にする必要がある。以上のようなことから、カンチレバーの新 しい励振法として、レーザ光照射による熱膨張を利用できないかどうかを検討した。



図 10-1: 微小カンチレバーの光熱応答。(左) ステップ状にレーザ光を照射したときのカンチレバーの変位応答。(右)変位応答の周波数特性(赤い線)。

カンチレバーは金コートされているので、金に吸収されやすい紫外光が有効であるが、生物試料 にダメージを与えやすい。そこで、波長 405nm のバイオレットレーザと波長 800nm 以上の IR レ ーザを用いて、どれくらい大きな変位が得られるのかを測定した。その DC 変位感度はバイオレッ トレーザの場合で約 10nm/mW、IR レーザの場合で約 1nm/mW であった。その後、バイオレット レーザはタンパク質に有害であることが判明したため、IR レーザのみを利用することにした(グ リーンレーザという選択もあるが、未だ試みていない)。微小カンチレバーでも熱伝導・拡散過程 は遅いと予想されるので、変位応答を測定した。その結果、図 10-1 に示すような応答が観察され た。応答はほぼ単一指数関数的に振舞い、応答時間はおおよそ 6.4 μs であったが、これよりもず っと長い応答時間成分も含まれていた。指数関数的応答は RC 回路の伝達関数の説明で出てきたように、1次ローパスフィルターで表される。従って、光熱応答の伝達関数 G(s)は

$$G(s) = \frac{a_1}{1 + s / \omega_1} + \frac{a_2}{1 + s / \omega_2}$$
(10-1)

と表される。従って、これに対する逆伝達関数 $\mathbf{G}^{-1}(s)$ で位相補償すれば、光熱過程を見かけ上な

くすことができる。 $G^{-1}(s)$ は

$$G^{-1}(s) = [1 + s / \omega_1] [1 + s / \omega_2] / [1 + s / \omega_3]$$
(10-2)

で与えられる。ここで、 $\omega_3$ は1/ $\omega_3 = a_1 / \omega_2 + a_2 / \omega_1$ で与えられる。式(10-2)は2つの「1+微 分」と1次ローパスフィルターの直列結合となっている。この回路を作成して補償の効果を調べた が、図 10-1の右図の黄色い線で示すように完全な補償を得ることはできなかった。そこで、6-2-3 節で説明した新しい補償法を試みたところ、図 10-2 に示すようにほぼ完全な位相補償を施すこと ができた。これにより、微小カンチレバーのQ値を小さくする制御ができるようになった。とこ ろで、微小カンチレバーの共振周波数はピエゾ素子を用いたZスキャナーのそれよりも遥かに高く、 それ故、応答は遥かに速い。探針・試料間の距離制御をZスキャナーではなく、カンチレバーに照 射するレーザ光で制御することができれば、フィードバック帯域は向上し、更なる高速イメージン グが可能になる。そこで、この新しい距離制御を用いた場合に、フィードバック帯域がどこまで



**10-2:** 新しい逆伝達位相補償法によって補償したカンチレバーの光熱励振の伝達関数のボード 線図。



図10-3: レーザ光による探針・試料間の距離制御を用いた場合のフィードバック帯域.

向上するかを調べた(図 10-3)。その結果、フィードバック帯域は 100kHz に達した(Zスキャナーを用いた場合には 60kHz 程度が限界であった)。このように高いフィードバック帯域が得られたので、ビデオレート(30ms/frame)でもイメージングすることができるようになった(図 10-4)。



**図 10-4:** レーザ光による探針・試料間の距離制御を用いたイメージング。 イメージング速度 30ms/frame, 240nmx240nm。

# 10-2. 位相イメージング

これまでは、試料の形状(Topography)のイメージングについて述べてきた。しかし、振動するカ ンチレバーには振幅以外に、共振周波数と位相という別の物理量が付随しており、これらの量は探 針・試料間の相互作用の性質を反映する。どのような性質が反映されるのかを以下に簡単に説明し よう。探針・試料間に働く力はこれらの間の距離の関数であり、F(z)は $F(z) \approx F_0 + \frac{\partial F(z)}{\partial z} z$ と近 似できる。 $k' = \partial F / \partial z$ とすると、カンチレバーの運動方程式(質点の運動で近似)は  $m \ddot{z} + \gamma \dot{z} + (k - k') z = f(t) + F_0$  (10-3)

となる。引力が働く場合には k' > 0、斥力が働く場合には k' < 0 であるので、引力の場合にはカン チレバーの共振周波数は減少し、斥力の場合には増大する。このときの変化(シフト)量  $\Delta f_c$  は、

$$\Delta f_c \approx -\frac{1}{2} f_c \frac{k'}{k} \qquad (10-4)$$

と近似される。また、探針・試料間に粘性的な力(散逸力)が働くと、粘性抵抗はy→y+y'と増

大し、位相が遅れる。この位相シフト量は

$$\Delta \theta \approx \theta \frac{\gamma'}{\gamma} \tag{10-5}$$

と近似される。

このような周波数や位相の変化(シフト)を検出する方法とし て2つのモードが利用されてきた。ひとつは振幅変調モード (AM-AFM)、もうひとつは周波数変調モード(FM-AFM)であ る。どのように検出するかを以下に説明する。AM-AFM はタッ ピングモードと同じである。ピエゾなどを用いてカンチレバーを 固定周波数で励振する。例えば、カンチレバーの共振周波数が+ 方向にシフトしたとすると、図 10-5 のようになる。縦の破線を 励振周波数だとすると、シフトする前(青い線)は共振周波数 と励起周波数は一致しており、振幅は最大で、位相は 90 度遅れ ている。+方向へのシフトにより、振幅は減少し、位相遅れは 90 度よりも少なくなる。励振信号とカンチレバーの振動信号と の間の位相差を計測すれば、探針・試料間に働く引力・斥力の 程度や粘性力の程度を検出できる。他方、FM-AFM ではカンチ レバーの「自励発振」を用いる(励振のための外部発信器を用 いない)。カンチレバーの変位センサーの信号を微分し適当なゲ インをかけた信号により励振のための素子(ピエゾやレーザ) を振動させる。最初、カンチレバーは熱的に揺らいでいるが、 カンチレバーの共振周波数付近では大きく揺らいでいる。それ

Amplitude Phase

図 10-5: 共振周波数のシフト により振幅と位相の変化。



図 **10-6:** FM-AFM の場合の共振 周波数シフトによる振幅と位相 の変化(ゼロ)。

故、励振素子の返された信号は共振周波数付近で大きい。その信号がカンチレバーを励振するので、 ますますカンチレバーは共振周波数付近で大きく振動するようになる。これらのサイクルが繰り返 されてエネルギーの供給と散逸が釣り合ったところで、一定の振幅で振動するようになる。カンチ レバーのQ値は大きくなる。振幅とQ値は微分のゲインにより決まる。さて、自励発振であるた め、励振信号の周波数とカンチレバーの共振周波数は常に一致している(従って、カンチレバーの 位相は常に励振信号に対して90度遅れている: 図10-6)。従って、FM-AFMでは位相ではなくて、 共振周波数のシフト量を検出することになる。

FM-AFM ではQ値は必然的に大きくなるが、AM-AFM では変わらない。図 **10-5** を見て分かるように Q 値が小さい(共振のスペクトルがブロード)場合には、位相シフト量は小さい。従って、 液中の AM-AFM では Q コントロール法を用いて Q 値を大きくする必要がある。

さて、我々はタンパク質の動的挙動を高速に捉えることを目的としており、カンチレバーの Q 値 を大きくせざるを得ない位相・周波数シフトの検出は適さないように思われる。しかし、我々のカ ンチレバーは小さく、共振周波数が高く、ばね定数は小さい(通常使われているものに比べて、こ れらの比は千倍以上大きい)。式(10-4)から明らかなように、微小カンチレバーでは大きな共振周波 数シフトを期待でき、それ故、大きな Q 値は不要なはずである。また、シフト量が大きければ、 ロックインアンプのような遅い位相検出装置は不要である。そこで、高速な位相検出装置を開発し た(図 10-7)。



図 10-7: AM-AFM における高速位相検出装置のブロックダイアグラム。

任意波形発生器からサイン波とのこぎり波を発生させる。これらの信号の位相差は発信器で調節 できるようになっている。サイン波でカンチレバーを励振する。センサーの信号からバンドパスフ ィルタを用いてノイズを除去し、ゼロクロスコンパレータで矩形波に変換する。その矩形波から1 周期ごとにパルスを作り、そのパルスのタイミングでのこぎり波の電圧を S/H でホールドする。カ ンチレバー振動の位相のシフトはパルスのタイミングをずらすので、ホールドされる電圧は変化す る。即ち、のこぎり波は位相一電圧変換器として働く。この検出装置の特徴は、カンチレバーの1

周期ごとに位相を検出でき るばかりでなく、検出するタ イミングを位相シフタを用 いて1周期のなかで動かす ことができるという点にあ る。従って、カンチレバー探 針が試料に近づいている場 合、或いは接触した直後など 色々なタイミングを選べる ことができ、最も大きく位相 シフトが起こるタイミング で検出が可能である。通常の AM-AFM では位相シフト量 はカンチレバー振動の1周 期にわたる平均値しか検出 できない。従って、カンチレ バーの振幅を十分小さくし て、振動している探針がほと



図 10-8: 新しい位相検出方式で捉えた微小カンチレバーの位相シ フト。探針を基板に近づけていくと振幅と位相が変化する。振幅が 自由振動振幅の 90%になる距離での位相シフト量は 11.5 度であっ た。振幅信号と位相信号のノイズレベルをほぼ一致させて表示して いる。位相の方が振幅よりも探針・試料間相互作用に敏感であるこ とが分かる。

んど常に試料と力学的に相互作用しているようにしなければならない。振幅を小さくすると、セン サーの S/N が悪くなるばかりでなく、走査中に振幅がなくなってしまい位相検出ができなくなるこ とも起こる。従って、凹凸の小さい試料でしか位相イメージングができない。 図 10-8 に探針を 試料に近づけていった場合に位相がどれくらいシフトするかを示す。

上記の測定では、カンチレバーのQ値は自然のQ値(2~3)である。従って、高速位相イメージン グが可能である。そこで、位相イメージングによく利用されるポリスチレン(ガラス質)-ポリブ タジエン(ゴム質)のブロックコポリマーをマイカにキャストしてゆっくり乾燥させて相分離させ た試料、及び、市販の位相イメージング用標準試料の位相イメージングを行った(図10-9)。振幅 値が一定になるようにフィードバックをかけながら、フィードバック出力をトポグラフィー像に、 位相検出装置の出力を位相像にしている。2チャンネルの同時イメージングである。



Topography

Phase

78 ms/frame, 350x175 nm

図 **10-9**: 微小カンチレバーと高速位相検出装置を用いてイメージングした Polystyrene-Polybutadiene Block-co-polymer(上段)と市販の標準試料のトポグラフィー像と位相像の高速 イメージング。

FM-AFM でも、微小カンチレバーでは大きな共振周波数のシフト量が期待でき、それ故、PLL のような遅い周波数シフト検出法は不要である。従って、Q 値が大きく AM-AFM に比べてイメージングを度は遅くなるものの、通常の FM-AFM に比べて高速なイメージングが可能なはずである。問題は PLL に代わる高速な周波数シフト検出装置を如何に作るかにある。我々は図 10-10 に示す装置を開発した。その原理を図 10-11 に示す。



図 10-10: 周波数シフトの高速検出装置の構成

バンドパスフィルター1(BPF1)は、その 中心周波数をカンチレバーの自然な共振周 波数に一致させ、且つQ値を大きくしてお く。バンドパスフィルター2(BPF2)は、 その中心周波数を高周波側に若干ずらせ、Q 値を小さくしておく。BPF2のQ値は小さい ので、カンチレバーの共振周波数がシフトし ても、BPF2を通過した信号の位相はほとん ど変わらない。BPF1のQ値は大きいので、 カンチレバーの共振周波数がシフトすると、 BPF1を通過した信号の位相は大きく変わ る。従って、BPF1,2を通過した信号をゼロ クロスコンパレータで矩形波にし、それらの 差を取る。その差を積分すると、図10-10 の右上に示したような波形が得られる。その



図 10-11: 高速周波数シフト検出の原理

プラトーになった電圧を S/H すれば、その電圧はカンチレバーの共振周波数のシフトの情報をもつ ことになる。位相シフタをセンサーの後に付けておけば、探針・試料間相互作用がないときのプラ トーの電圧をゼロにしておくこともできる。また、カンチレバーの1周期内の任意の位置における 周波数シフト量を検出することもできる。

この検出系を用いて図 10-8 に示したのと同様な試験を行ったところ、AM-AFM とは比較になら ないほど、検出信号は探針・試料間相互作用に敏感であった(図 10-19)。この高い感度は Q 値が 大きいことと、微小カンチレバーの共振周波数シフト量が大きいためである。周波数シフト検出装 置の感度はおおよそ 0.17V/kHz であるので、図 10-19 のデータから、1nm あたり 4.4kHz もの大き な周波数シフトが起こっていることがわかる。この新しい FM-AFM でイメージングした例は未だ 少ないが、図 10-20 に紫膜の像を示す。イメージング時間は約 2 秒であるが、通常の FM-AFM に 比べて圧倒的に速い。



図 10-19: FM-AFM 用の新しい周波数シフト検出法で 捉えたカンチレバーの周波数シフト。



図 10-20: 紫膜の FM-AFM 像。 25nmx25nm, 1.9s/frame。バクテリオ ロドプシン3量体が作る格子構造が 見えている。

#### 10-3. フィードフォワード制御法



図 10-21:1 ライン走査毎のフィードフォワード制御系のブロックダイアグラム。

図 5-3 で示したように、フィードバック帯域は 2A<sub>0</sub>/h<sub>0</sub> (試料の高さに対するカンチレバーの Peak-to-peak 振幅)の関数であり、試料の高さが高くなるほどフィードバック帯域は下がる。カン チレバーの自由振動振幅を大きくすればよいのだが、大きくすると脆い生物試料へのダメージが問 題になる。この試料の高さ効果をできるだけ少なくする目的で1ライン毎のフィードフォワード制 御法を試みている。フィードバック制御がカンチレバーの振幅情報を得てから探針・試料間の距離 を調節する後追い制御であるのに対して、フィードフォワード制御は振幅情報を得る前に試料ステ ージを Z 方向に動かす。その動かす情報には1ライン前の試料の高さ情報を利用する。1ラインの 差で大きな高さの変化があることは稀であるので、この制御によりカンチレバー探針から見た試料 の高さは小さくなり、その結果フィードバック帯域は上がる。図 10-21 に製作したフィードフォワ ード制御系を示す。1ラインの高さ情報を、フィードバック信号、フィードフォワード信号、及び エラー信号の和として取得してメモリーに蓄えつつ、1ライン前の走査で蓄えた高さとフィードバ ック信号の和でZ スキャナーを動かす。このとき、蓄えておいた高さ情報よりも少なめにフィード フォワード信号を出力する。エラー信号を加算する理由は、エラーをそのままにしておくと、フィ ードフォワード制御ではエラーが蓄積していくからである。また、少なめにフィードフォワード信



図 10-22: フィードフォワード効果に対する Y 方向の高さ変化の影響。

号を出力するのは、フィードフォワード制御により却って逆効果の場合もあるからである。Y方向 に高さが変化しない場合にはフィードフォワード制御は極めて有効なのは当然である(図 10-22a)。 Y方向に高さの差がある場合には有効性は減る(図 10-22b)。完璧な方法ではないが、或る程度は フィードバック帯域を上げることができる。

## 10-4. AFM 像を原子モデルに照らして理解

AFM の解像度は原子モデルの表面のそれよりも劣るが、電子顕微鏡並みの解像度も条件が整え ば出せる。AFM 像を原子モデルに照らして理解することができれば、AFM 映像から原子モデルの どこがどのように動いているかを知ることができるはずである。もちろん、AFM 映像ではタンパ ク質は動いており、原子モデルは静止している。従って、完全な対応付けは難しいであろう。それ でも尚、或る程度の対応付けはできるのではないか。非常に特徴のある形態をもつタンパク質なら ば、像を見ただけである程度の対応付けができるであろう。あまり特徴のない形態のタンパク質の 場合には、計算によりフィッティングするしかないであろう。タンパク質が大きく変形する場合で も、全体の構造が大きく変化することはあまりなく、ドメイン間の相対的な位置が変化するような 場合が多い。それ故、部分フィッティングできる可能性もある。現在、計算により照合ができるか どうかを、ミオシンIIの頭部を用いて検討している。

まず原子モデルから表面の座 標を求め、表面の立体像を得る (図 10-23)。次に、その立体像 を色々な向きを置き、探針の太 さの効果を取り入れた擬似 AFM 像のライブラリーを作成 する(図 10-24)。



図10-23: ミオシン II 頭部の原子モデル(a)とその表面立体像(b)。



図 10-24: 色々な角度から見た原子モデルの表面立体像(赤)から作成した擬似 AFM 像(白黒)。 数字は水平軸の周りに回転させた角度。

次に、実際の AFM 像と擬似 AFM 像のトップビューの二次元の輪郭のフィッティングを行い、擬似 AFM 像ライブラリーから候補を選ぶ。次にその候補と AFM 像の3次元のフィッティングを行い、

ベストスコアを与えた擬似 AFM 像を最終的に選ぶ。この2段階のフィッティング結果を図 10-25 に示す。四角で囲んだものがベストスコアを与えた擬似 AFM 像とその元になった原子モデルの表面立体像である。この結果の成否を判断することは難しいが、この配置では、ミオシン II の頭部は向う側にプラス電荷のクラスターをもっており、負に帯電したマイカ表面に吸着するには都合がよい。従って、以上の計算による照合はある程度信頼できるものと判断される。



図 10-25: AFM 像と擬似 AFM 像のフィッティング。「0」は AFM 像。「1~3」は 2 次元輪郭像フィッティングにより残った候補。四角で囲んだものは 3 次元フィッティングでベストスコアを 与えた擬似 AFM 像(上)とそのもとになった原子モデルの表面立体像。

#### 10-5. 探針の先鋭化

探針のアスペクト比、及び、先端曲率半径は AFM の解像度に大きな影響を与える。細ければ細 いほど良いが、あまり細くなると先端が壊れやすくなる。現在は走査型電子顕微鏡のチャンバー内 にコンタミネーションしているガスの雰囲気下で EBD 探針を形成させている。プラズマエッチン グ処理により先鋭化できるが(図 10-26)、丈夫でないために壊れやすい。壊れた探針でイメージ ングするとダブルイメージがよく観察される。そこで、いくつかの改良を現在進めつつある。(1) 低真空 SEM を用いてガスとしてメタンガス、或いは、エタノールを導入し、EBD 探針を形成する。 ドイツのナノツール社では、ガスの組成や圧力などの条件は公開されていないが、先端曲率半径 2nm 程度でアスペクト比の高い EBD 探針に成功しており、且つ、探針の中にダイヤモンドライク な粒子が入っていて頑強であると言われている。(2)カーボン基板にカンチレバーを置き、そこにア ルゴンイオン銃を用いてアルゴンイオンを照射すると、窒化シリコンの探針部にのみカーボンナノ ファイバーができることが知られている。この方法は触媒も不要でバッチ処理が不要で極めて簡便 な方法であるので、現在この方法も検討している。(3)エタノールガスの雰囲気下で加熱すると、金 属触媒をつけた箇所からのみ単層カーボンナノチューブが成長することが知られている。触媒を付 けること、及び加熱が必要なことから面倒な方法であるが、最も細く丈夫な探針が形成される。



図 10-26: プラズマエッチングによる EBD 探針の先鋭化。(a)(c):処理前、(b)(d):処理後

## 11. 1 分子力学計測

古くは表面力測定装置(Surface Froce Apparatus)を用いて分子間に働く力の計測が行 われてきたが、AFMの誕生後、1分子レベルで の力学測定が行われるようになった。AFM ばか りでなく、マイクロニードル法や光ピンセット 法、柔らかい膜胞をマイクロピペットに吸引固 定し、その膜胞の変形より力を見積もる Bioforce probe 法も用いられるようになった(図 11-1)。 力学計測の目的は様々である。ここでは、運動 や力発生といった生理機能をもつモータータン パク質がどのくらい大きな力を発生するとか、 ATPase 反応とどのようにカップルしているの か、といったことを知る目的で行われる力学計 測については述べない。



図 11-1: 色々な力測定法

これまでに行われた力学計測を分類すると、

- (1) タンパク質や細胞の(粘)弾性
- (2) 特異的複合体の結合力(基質-タンパク質、タンパク質-タンパク質、DNA 鎖間、細胞-細胞 など)
- (3) タンパク質や DNA の伸展力(Unfolding 力)

に分けられるであろう。タンパク質の弾性測定の目的は、タンパク質の物性としての硬さ(ヤング 率)と構造変化の指標としての硬さの変化を知ることであるが、研究例が少ないと同時に生理的に 意味のあるデータは出されていない。細胞の(粘)弾性は細胞骨格との関係で生理的に重要な量と 考えられ、多くの例が報告されている。結合力(破断力)は、生体分子機能の重要な素過程が認識・ 結合にあることから、様々な系で研究されている。例えば、水素結合の強さ、化学結合の親和性と 物理的結合力の関係、相互作用のエネルギー地形図、結合有効部位(ミューテーションと組み合わ せて)、などを求めるといったことを目的に研究が行われている。タンパク質の2箇所を掴まえて、 引き離すことにより伸展変性過程を力計測から求めることが行われている。タンパク質のフォール ディング過程との関係、タンパク質の受動的な力学的機能との関係、或は分子シャペロンによるペ プチド鎖のフォールディング過程との関係、で興味がもたれるが、生理的意義に直結するような報 告例は少ない。以上の力学計測はかなり多く行われているものの、タンパク質の生理機能や物理的 な仕組みの理解に役立つほどの成果はまだ得られていない状況にある。新しいツールを手にして 色々な試みがなされている、といった段階であろうか。

## 11-1. Force Modulation と粘弾性イメージング

探針から試料にかける力を振動させ(Force Modulation)、そのときのカンチレバーの振る舞い(振幅や位相)を測定することにより、試料の弾性・粘性 の性質を知ることが可能である。2次元でこの測定を 行えば、試料の物性マップを得ることができる。とき として試料の凹凸以上に精細な画像を得ることがで きる。力をモジュレートするために、通常試料ステー ジを上下に振動させるか(以下の説明)、カンチレバ ー支持部を振動させる(図 11-2)。

簡単のため、試料の変形は Herz の理論に従うと仮 定する。2つの球の接触領域半径*a* と押し込み距離*る* は



 $a = (RDF)^3, \quad \delta = a^2 / R \quad (11-1)$ 

と表される(4.1節参照)。試料は平面、探針は半径 R

図 11-2. フォースモジュレーション法の 原理。

の球とする、また試料の弾性定数を $k\left(=\left(1-\sigma^2\right)/E\right)$ 、探針は十分硬く弾性は無視できるものとすると、

$$\delta^3 = \frac{9}{16} \frac{k^2}{R} F^2 \tag{11-2}$$

探針・試料間の力 F には F<sub>0</sub>のまわりにモジュレーシンがかかるので、

$$F \approx F_0 + \frac{\partial F}{\partial \delta} \delta + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 F}{\partial \delta^2} \delta^2 = F_0 + K_{eff} \delta + 0.5\beta \delta^2$$
と展開すると、

$$\frac{\partial F}{\partial \delta} = \left(\frac{6RF_0}{k^2}\right)^{1/3} = K_{eff} , \quad \frac{\partial^2 F}{\partial \delta^2} = \left(\frac{4R^2}{3k^4}\right) \times F_0^{-1/3} = \beta \quad (11-3)$$

モジュレーションを試料ステージの高さの変化  $z_0 \sin(\omega t)$ で与えたとすると、カンチレバーの撓み  $\exists z_0 \sin(\omega t) - \delta$ であるので、カンチレバーのバネ定数を  $k_c$ とすると

$$k_{eff} \,\delta + 0.5\beta\delta^2 = k_c \left( z_0 \sin \omega t - \delta \right) \tag{11-4}$$

非調和項の寄与は調和項に比べてずっと小さいので、

$$\delta = \frac{k_c}{k_c + K_{eff}} z_0 \sin(\omega t)$$
(11-5)

ここで、粘弾性の線形モデルを簡単に述べる。ストレス(圧力 $\sigma$ )と歪み率(ストレイン $\varepsilon$ )との 関係は高分子の場合マックスウェルのモデルが適用されることが多い。このモデルでは、系は弾性 率Gのバネと粘性係数 $\eta$ のダッシュポッドが直列につながる。バネの歪みを $\varepsilon_s$ 、ダッシュポッドの それを $\varepsilon_d$ とすると系全体の歪み率は $\varepsilon = \varepsilon_s + \varepsilon_d$ である。各要素では

$$\sigma = G \varepsilon_s$$
,  $\sigma = \eta \frac{d\varepsilon_d}{dt}$  (11-6)

これらより、

$$\frac{d\sigma}{dt} = -\frac{G}{\eta}\sigma + G\frac{d\varepsilon}{dt}$$
(11-7)

ストレインをサインでモジュレートすると ( $\varepsilon = \varepsilon_0 \sin(\omega t)$ )、ストレスは定常状態では  $\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \varphi)$ のように応答する。系全体のストレス・ストレイン関係は複素弾性率 $G^*$ を 用いて、

$$\sigma(\omega) = G^*(\omega) \bullet \varepsilon(\omega) \tag{11-8}$$

$$G^{*}(\omega) = G'(\omega) + i G''(\omega) , G^{*}(\omega) = \widetilde{G}(\omega) exp(i \Theta(\omega))$$
(11-9)

ここで、*G*'と*G*''はそれぞれ、動的(保存的)弾性率、及び、損失弾性率という。動的弾性率は 弾性応答を表し、損失弾性率は粘性応答を表し、励起1周期におけるエネルギー散逸に関係してい る。

さて、実際の AFM の測定では、試料ステージをサイン波で上下させて弾性体であるカンチレバ ーの応答(振幅、位相)を測定する。試料そのものの変形とかかる力を直接測定しているわけでは ないが、次の関係が成り立つ。

$$G^* = \frac{\sigma}{\varepsilon} = H \frac{F}{\delta}$$
 (11-10)

ここで、Hは形状因子とよばれ、実際に測定される力と変位をストレス、ストレインに結びつける。試料ステージの変位 $z_1$ により試料は励起され、バネ定数 $k_c$ をもつカンチレバーに位相シフトした変位応答 $z_2$ としてが現れ、その応答は試料に働く力 $F_2$ に関係ずけられる。すなわち、

$$z_{1} = z_{0}e^{i\omega t}$$

$$z_{2} = z_{0}'e^{i(\omega t + \varphi)}$$

$$F_{2} = f_{0}e^{i(\omega t + \varphi)} = k_{c}z_{2} \qquad (11-11)$$

試料ステージの変位から試料の歪みを引いたものがカンチレバーの変位であるから、 $\delta = z_1 - z_2$ 。 従って

$$F_2(\omega) = \frac{1}{H} \left[ G^*(\omega) z_1(\omega) - G^*(\omega) z_2(\omega) \right] = k_c z_2(\omega)$$
(11-12)

故に、

$$G^{*}(\omega) = \frac{Hk_{c}z_{2}(\omega)}{z_{1}(\omega) - z_{2}(\omega)} = \frac{Hk_{c}z_{0}'e^{i\varphi}}{z_{0} - z_{0}'e^{i\varphi}}$$
(11-13)

$$G'(\omega) = \frac{H \gamma k_c(\cos \varphi - \gamma)}{\gamma^2 - 2\gamma \cos \varphi + 1}$$
(11-14)

$$G''(\omega) = \frac{H\gamma k_c \sin\varphi}{\gamma^2 - 2\gamma \cos\varphi + 1}$$
(11-15)

粘性が弾性要素よりも小さい場合には、位相差は小さく、 cos φ ≈1 とおけて、

$$G'(\omega) \approx \frac{\gamma}{1-\gamma} Hk_c \qquad G''(\omega) \approx \frac{\gamma}{(1-\gamma)^2} Hk_c \sin\varphi \qquad (11-16)$$

1-yは試料の圧縮率を表す。従って、試料ステージを上下に変位させたときのカンチレバーの変位(振幅)から試料の弾性についての情報が得られ、位相差から粘性についての情報が得られる。

試料ステージを振動させる代わりに、カンチレバーを振動させて位相差像を得ることもできる。 この方が現在では一般的だが、非線形減少を扱うことになり、解析が難しい。しかし、振幅情報が 弾性の性質を、位相情報が粘性的性質を現すことには違いがない。



# 11-2. 破断(結合)力に関する理論

物体間の結合の強さを知るには、その結合を切るのに必要な力の大きさを計ればよい。このこと

は結合のエネルギーが大きいマクロな世界では正しい。しかし、生体分子間の結合のように、その 結合エネルギーの大きさが熱エネルギーとそれほど違わない場合には、そう単純ではない。しかし、 AFM による生体分子間力の測定が行われ始めた頃は、測定される破断力が結合の力であると素朴 に解釈されていた。生体分子間の特異的結合は平衡では通常結合・解離を行っている。力を加えな くても解離は起こる。それ故、結合の力とは一体どのように定義できるのであろうか。系に力をか けると解離しやすくなるが、解離に必要な力の大きさ、結合の寿命と力との関係、力をかける速さ と破断力との関係、及び、その関係における自然な結合・解離定数(或はエネルギー地形図)の関 わり、といった複雑さが伴う。この問題に対する理論的な考察が行われている。 古典的な Bell の 理論と、それを発展させた Evans の理論を紹介する。

#### 11-2-1. G.I. Bell's Theory

Bell は 1978 年に細胞間結合について理論的な考察を行った。その基本的な考え方は特異的な分 子間結合にも拡張できるものである。複数の結合サイトをもつ系に引き離す方向の力が加えられた 場合に、系の結合寿命はどうなるであろうか。複数のボンドは結合・解離を行っており、すべての ボンドが解離する確率は極めて低く系が離れることは起こらない。弱い力を加えた場合には部分的 にボンドは切れるが、結合寿命は力を加えない場合に比べて短くはなっても、ある程度の時間は2 つの系は結合したままでいられる。大きな力を加えれば、瞬間的に離れるであろう。力を加えたと きの2つの系の結合寿命は、自然なひとつのボンドの結合・解離の速度と力に依存する。その依存 関係がどうなっているかを Bell は考察し、破断に必要な力を見積もった。



互いに結合するサイトをもつ2つの膜系1,2が互いに接近して置かれているとする(図 11-5)。 系1の結合サイトの総数を $N_1$ ,系2の結合サイトの総数を $N_2$ とする。これらは、膜上を拡散で きるものとする。結合しているサイトの数を $N_b$ 、フリーのサイトの数を $N_{1f}$ , $N_{2f}$ すると、

$$N_i = N_{if} + N_b \quad (i = 1, 2) \tag{11-17}$$

サイトの結合・解離の速度定数をそれぞれ $k_+$ 、 $k_-$ とすると、

$$\frac{dN_b}{dt} = k_+ N_{1f} N_{2f} - k_- N_b = k_+ (N_1 - N_b) (N_2 - N_b) - k_- N_b$$
(11-18)

平衡条件では、(9-18)はゼロで

$$N_b = \frac{1}{2} \left( N_1 + N_2 + \frac{1}{K} \right) - \frac{1}{2} \left[ \left( N_1 + N_2 + \frac{1}{K} \right)^2 - 4N_1 N_2 \right]^{1/2}$$
(11-19)



ここで、 $K = k_{+} / k_{-}$ である。ひとつのボンドのポテンシャルエネルギーをU(r)とする(図 11-6)。 rは結合軸方向の距離で、結合したときゼロとする。結合したときの自由エネルギーを $-E_{0}$ とし、 解離する方向に力 fを加えると、ひとつの結合の寿命は

$$\tau = \tau_0 \ \exp\left[\left(E_0 - \gamma \ f\right) / kT\right] \tag{11-20}$$

と書ける(注:これは本当かな?何故自由エネルギーと寿命が直結するのか?)。ここで $\gamma$ は経験的な結合距離で、 $\sim r_0$ ある。さて、膜系に解離方向に力Fを加えたとしよう。解離速度定数 $k_$ は $k_exp(\gamma F / kT N_b)$ に置き換えられる。簡単のために $N_2 >> N_b$ とすると、(11-18)式は

$$\frac{dN_b}{dt} = k_+ (N_1 - N_b) N_2 - k_- N_b \exp(\gamma F / kT N_b)$$
(11-21)

と置き換えられる。時刻ゼロ以前では力は加えられていなかったとすると、時刻ゼロでのボンド数  $k N_b(0) = K N_2 N_1 / (1 + K N_2)$ 。解離の方向に弱い力を加えると、解離定数は大きくなるが、直 ぐに新しい平衡に達して、ボンドの数は

$$N_b = KN_2N_1 \exp(-\gamma F / kT N_b) / \left[1 + KN_2 \exp(-\gamma F / kT N_b)\right] \quad (11-22)$$

に達するであろう。大きな力を加えれば、式(11-21)の右第2項は第1項に比べて大きくなり、結合 ボンドの数は急速にゼロになるであろう。この中間には臨界的な力 $F_c$ (膜を引き離すにちょうど 十分な大きさ)が存在するに違いない。式(11-21)右辺の2項の大きさを $N_b$ の関数として比べると

図 11-7 のようになる。第1項の直線が第2項の曲線に接するときに臨界的な力になっていると考えられる。式(9-21)右辺を y<sub>1</sub> - y<sub>2</sub> とすると、

$$y_{1} = y_{2}, \quad \frac{\partial y_{1}}{\partial N_{b}} = \frac{\partial y_{2}}{\partial N_{b}} \downarrow \psi,$$

$$f_{c} \equiv \frac{F}{N_{1}} = \frac{kT}{\gamma} \alpha_{c} \qquad (11-23)$$
ここで、 $\alpha_{c}$ は  
 $\alpha_{c} \exp(1 + \alpha_{c}) = KN_{2} \qquad (11-24)$   
の解。 $KN_{2}$ が大きいところでは、  
 $\alpha_{c} \approx 0.7 \ln(KN_{2})$ 。式(9-21)を数値計算で解いて、



図11-8: 結合寿命と力の関係

 $N_b$ がゼロになるまでの時間  $t \in f / f_c$ の関数として表すと図 11-8のようになる。 $f / f_c$ >1では、 寿命の力依存性は単純になる。

$$t(F) \approx \frac{exp(-\gamma F / kTN_b(0))}{k_{-}(1 + \gamma F / kTN_b(0))}$$
(11-25)

以上が Bell 理論の概略である。結合寿命が力によって exponential 的に減少することを示した点で重要である。Bell の理論では結合のエネルギー地形図の情報は一つのパラメーター γ にまとめられている。

## 11-2-2. E. Evans の理論

実際の実験では、外力をステップ状に加えずに徐々に力を加えていき、破断を見る。この場合、結合のポテンシャルエネルギー分布は徐々に変わっていく。従って、最も高い頻度で観測される破断力は力を加えていく速さに依存する。この破断力と力を加える速さの関係から、結合の地形図の情報を推測できるとするのが、Evansの理論である。しかし、Bellの理論を実際の実験に合わせるように修正したことと、若干複雑な系にまで拡張した点を除けば、それほど斬新ではない。少々長いが彼の理論を追ってみよう。

まず、単一のボンドで考える。液体中の反応の基礎理論は 60 年前の Krammers の理論に従う。エネルギー最小の結合状態からの解離は、エネルギー地形図のなかの経路に沿った拡散的な流れとしてモデル化される。そのような経路はいくつもあるであろうが、外力はひとつの経路を選ぶ。その経路の座標を×で表す。この経路に沿った解離の速度定数 *k*\_はエネルギー地形図 *E*(*x*)が外力 *f*によってどのように歪むかに依存する。

$$k_{-} = k_{0} \exp\left[-E_{b}(f)/k_{B}T\right]$$
(11-26)

ここで、 $E_b$ はエネルギー障壁の高さ(活性化エネルギー)を表す。 $k_0$ は、結合ポテンシャル分布 が存在する領域内を拡散するのにかかる時間(拡散緩和時間)の逆数とおおよそ考えてよい。エネ ルギー最小位置からエネルギー障壁の頂点までの距離を $x_\beta$ とすると、外力によりエネルギー障壁 の高さは

$$E_b(f) = E_b(0) - f x_\beta$$
 (11-27)  
のように表せるであろう(障壁の位置や形の力による変化は無視できるとする)。熱揺動力のスケ  
ールを概算すると $f_\beta = k_B T / x_\beta$  (~4 pN;  $x_\beta \approx 1$  nm)。解離の速度定数  $k_$  は

$$k_{-} = \left(1/t_{off}\right) exp\left(f x_{\beta} / k_{B} T\right) = \left(1/t_{off}\right) exp\left(f / f_{\beta}\right)$$
(11-28)

ここで、 $t_{off}$ は外力がない場合の結合寿命である。外力fが $f_{\beta}$ に達するか、越すと、指数関数的に破断が起こる。(注:ここまでの議論は、Bellの理論と形の上で同じだが、 $k_0$ と $E_b$ の解釈が異

なる。)

さて、実際の破断や伸展の実験では力は徐々に加えられる。この破断への効果を考えよう。時間と ともに力が大きくなるにつれて、結合寿命(破断確率)はどんどん短く(大きく)なっていくであ ろう。どこかで破断したとして、そのときの外力の大きさをデータにとり分布を求めると、山形の 分布になるであろう。その分布のピークを与える力を結合力(或は破断力)とみなすことになる。 結合状態にある確率を $S_1(t)$ 、解離の状態にある確率を $S_0(t)$ とすると、

$$\frac{dS_1(t)}{dt} = -k_- S_1(t) + k_+ S_0(t)$$
(11-29)

引き離す速さを $v_s$ 、測定子のバネ定数を $k_s$ とすると、 $f(t) = v_s k_s t$ 。f が $f_\beta$ よりもおおきいよう な大きく平衡からずれた場合には、エネルギー障壁を越すと引き離す方が拡散によって戻るよりも 速いので、再結合はできないと考えられる。この場合には

$$\frac{dS_1(t)}{dt} = -\frac{1}{t_{off}} exp(f / f_\beta) S_1(t)$$
(11-30)

これを解くと、

$$S_1(t) = exp\left[-\frac{1}{t_{off}}\frac{f_{\beta}}{v_s k_s} \left(e^{f(t)/f_{\beta}} - 1\right)\right]$$
(11-31)

カの大きさが $t \ge t + \Delta t$ のときに破断が起こる確率は、 $\rho(t) \Delta t = k_{-}(t)S_{1}(t) \Delta t$ である。この確率が 最大になる条件 $d\rho / dt = 0$ から最も破断しやすいカ $f^{*}$ が求められる。

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{dk_{-}(t)}{dt}S_{1}(t) + k_{-}(t)\frac{dS_{1}(t)}{dt} = S_{1}(t)\left[\frac{dk_{-}(t)}{dt} - k_{-}^{2}(t)\right] = 0 \quad \text{ is } 0,$$

$$\frac{dk_{-}(t)}{dt} = k_{-}^{2}(t) \quad (11-32)$$

が最も起こりやすい破断力を与える。これを解くと

$$f^* / f_{\beta} = ln \left( t_{off} k_s v_s / f_{\beta} \right) = ln \left[ (\Delta F / \Delta t) / (f_{\beta} / t_{off}) \right]$$
(11-33)

となり、破断力は力を加える速さ $k_s v_s$ の対数に比例することが分かる。違う言い方をすると、自然寿命の時間内に熱揺動力が働く速さよりもどれだけ速く力を加えるか、すなわち、 $(\Delta f / \Delta t) / (f_\beta / t_{off})$ の対数に破断力は比例する。その比例係数は $f_\beta$ である。

図 11-9 に測定例を示す。biotin 化した diC14 分子を lipid:cholesterol 膜から引き抜く力が測定されている。 傾き  $f_\beta$  からエネルギー障壁までの距離  $x_\beta$  が見積もれるが、この例の場合,、 $x_\beta \approx k_B T / f_\beta \approx 2$  nm が得られ、diC14 の膜への挿入距離にほぼ等しくなっている。破断力 vs. (力

を加える速さ)のグラフ (直線) を  $f^* = 0$  に外挿したときの横軸の切片 (すなわち、 $t_{off}k_sv_s / f_\beta = 1$ のとき)から  $t_{off}$  を見積もることができるが、この例では約 30 秒である。しかし、溶液中で実際に測定された off rate に比べて 50 倍も速くなっている。溶液中では弱い相互作用で分子を引き止めているので長くなっていると考えられる。力を加えた場合には、そのような弱い相互作用は外力のために起こらない。



図 11-9: biotin-PEG-deC14PE1 分子を Lipid:Chlesterol vesicle から引き抜く カと力を加える速さとの関係。BFP 法 で測定。(Ludwig & Evans, 2000)

このような違いがあるものの、 $f^* = 0$ への外挿値は有効な情報である。切片の値は - $E_b / k_B T + ln(k_0 f_\beta)$ であり、 $k_0$ が一定だとすれば、化学修飾によるエネルギー障壁の変化を、  $\Delta E_b / k_B T \approx -ln(\Delta f / \Delta t)_{f^*=0} + \Delta ln(f_\beta)$ のように知ることが可能である。

ここまでの議論は単純な分子結合の場合であり、複数のローカルミニマムをもつような複雑な結合 ポテンシャルをもつ分子結合に対しては修正が必要になる。破断に至るまでに何個ものエネルギー 障壁を越えなければならない。隣り合うエネルギーミニマムを遷移する速度は

$$\frac{dS_n}{dt} = -(k_{n,n-1} + k_{n,n+1})S_n(t) + k_{n+1,n}S_{n+1}(t) + k_{n-1,n}S_{n-1}(t)$$
(11-34)

で、最後に解離するステップでは、

$$\frac{dS_0}{dt} = -k_{0,1} S_0(t) + k_{1,0} S_1(t)$$
(11-35)

と表せる。解離方向の速度定数は $k_{n,n-1} = \frac{1}{t_{off}(n)} exp[f / f_{\beta}(n)]$ 、他方、結合方向の速度定数は  $k_{n-1,n} = k_{n,n-1} exp[-(E_n - E_{n-1}) / k_B T]$ であり、隣り合うエネルギーミニマムの差に依存する。エ ネルギーミニマムも力で変化すると考えられる。(11-28)式は次のように修正される。  $k_{-} = 1 / \sum_{n} t_{off}(n) exp[-f(t) / f_{\beta}(n)]$  (11-36) 結合状態を全部ひっくるめれば、(11-29)式はそのまま成り立つので、破断力を与える式は同様に (11-32)式で与えられる。これを解くと、

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = 1 / \sum_{n} \frac{t_{off}(n)}{f_{\beta}(n)} exp\left[-f^* / f_{\beta}(n)\right]$$
(11-37)

この場合には、 $f^*$ は力を加える速さの対数( $ln(\Delta f / \Delta t)$ )に素直には比例しない。Biotin-streptavidin で測定された結果(図 11-10)は、その一例と考えられる。この例では、部分的な直線を結んだ形になっており、各直線部分の傾きは $f_{\beta}(n) = k_BT / x_{\beta}(n)$ と考えられる。最も傾きの大きいところで

は、 $x_{\beta}$ ~0.1 nm、中間の傾きでは、 $x_{\beta}$ ~0.5 nm となり、これらの結果は、力を加える速さを実験 では不可能なほど大きくして分子動力学計算して得られた結果とよく一致する。こうして、ダイナ ミックフォーススペクトロスコピー(DFS)は、分子相互作用の中を見ることができ、主要な遷移状 態の性質を正確に決定することができる。



図 **11-10**: Streptavidin に結合した biotin 1 分 子の破断力と力を加える速さとの関係。 BPF 法で測定。2 つのポテンシャル障壁が あるとした場合、(9-37)式とよく一致する。 (Merkel et al., 1999)

上述の議論は単一のボンドに関する議論であり、複数 のボンドをもつ系にまで拡張する必要がある。例えば、 高分子間の単一の結合でも結合サイトは必ずしも一 つではなく、いくつかのサイトでボンドを形成する。 この問題を扱うことはかなり難しい。加えた力が各ボ ンドにどれだけ配分されるとか、結合サイト間の共同 性といったことは予め知ることができないからであ る。ここでは複数のボンドを3つのケースで考える (図 11-11)。(1)直列につながったボンド、(2)ジッパ ータイプのボンド、(3)並列につながったボンド。直



図 11-11 複数のボンドをもつ結合の型 と力の加え方

列のボンドでは加えた力は全てのボンドに等しくかかる。ジッパータイプでは、力は最初のボンド にだけかかり、一旦そのボンドが切れると、力は隣のボンドにかかる。並列の場合には、力は各ボ ンドに分配される。まず、完全に共同的に破断する場合で、直列と並列ボンドを考えよう。つまり、 一度に破断すると考える。この場合には、ボンドの集合をひとつのマクロなボンドと捉えることが できる。このマクロなボンドのエネルギー障壁は個々のエネルギー障壁の総和によって与えられる。 それ故、力を加えないときの完全解離の時間は

$$t_{N-off} = Nt_0 \exp(NE_b / k_B T) = Nt_{off} \exp[(N-1)E_b / k_B T]$$
と考えられる ( $t_0 \equiv 1 / k_0$ 自身も N 倍長<

なる)。但し、直列の場合には個々のボンドは長さに寄与するので、マクロなひとつのボンドのエネルギー障壁までの距離は個々のボンドのエネルギー障壁までの距離の N 倍になる。力を加えたときのマクロなひとつのボンドの解離速度定数は、(11-36)式をもモディファイして、次のようになる。

直列の場合には、

$$k_{-} = \frac{1}{Nt_{off} \exp[(N-1)E_b / k_B T]} \exp[N f / f_{\beta}]$$
(11-38)

並列の場合には、

$$k_{-} = \frac{1}{Nt_{off} \exp[(N-1)E_b / k_B T]} \exp[f / f_\beta]$$
(11-39)

もっとも確からしい破断力を与える式(11-32)を解くと、

$$f^* = \frac{f_{\beta}}{N} \left[ ln \left( \Delta f / \Delta t \right) - ln f_{\beta} + ln t_{off} + 2 ln N + \frac{(N-1)E_b}{k_B T} \right]$$
(11-40)

$$f^{*} = f_{\beta} \left[ ln \left( \Delta f / \Delta t \right) - ln f_{\beta} + ln t_{off} + ln N + \frac{(N-1)E_{b}}{k_{B}T} \right]$$
(11-41)

等価なボンドがジッパーに沿って並んだ場合には、×方向に同じ形をした結合ポテンシャルがつながる。それ故、複雑な単一ボンドを考えたときの議論がそのまま成り立つ。それ故、(11-37)式で $f_{\beta}$ と $t_{off}$ がnに依存しないと考えればよい。そうすると、

$$f^* = f_{\beta} \left[ ln \left( \Delta f / \Delta t \right) - ln f_{\beta} + ln f_{off} + ln N \right]$$
(11-42)

単一の単純なボンドの破断力よりも $f_{\beta} \ln N$ だけ大きくなるだけである。

もっと複雑な場合はここでは省略する

## おわりに

20 世紀には分子の動きをナノメータの解像度で捉えることはできなかった。例えば、筋肉のク ロスブリッジ(ミオシンの頭部・ネック領域)の回転が筋収縮の起こる原因であるという説を証明 するために、X線回折法、蛍光法、電子顕微鏡法、ESR、X線小角散乱法など様々な手法を用いて その運動を捉えようとする研究が膨大な時間とお金をかけて行われてきた。それでもなお、この問 題は解決されていない。2001 年に高速 AFM が開発され、これによって分子の動きを数 10 ms オ ーダの時間分解能で捉えることが初めて可能になった。最大の障害であった探針・試料間に働く大 きな力によって脆い試料が走査中に破壊される問題もかなり解決された。更に高速に且つ安定に走 査できるスキャナーや試料の基板への固定法などの技術的進歩とともに、様々な系において機能動 態が手に取るように映像として観察され、その機能発現のメカニズムが詳細に明らかにされていく に違いない。筋肉のクロスブリッジの運動、トラックに沿って運動しているモータータンパク質、 ポリペプチドをタンパク質へと折れたたんでいるシャペロニン、ポリペプチドを合成しているリボ ソームなど、多様な分子機械が生理作用を営んでいるときの様子が眼前に繰り広げられるであろう。 更には、高速 AFM で得た映像をX線結晶構造解析で求めた原子モデルと比較することで、動的原 子モデルを構築することも夢ではないであろう。高速 AFM が早く世界に普及し、タンパク質研究 の新しい展開が起こることを願っている。

# 付録 A. カンチレバーの力学

# A-1. 静力学

**図 A-1a** に示すように長さ *L*、断面が均一で長方形(面積 *S*)のカンチレバーの面に垂直に、支 点から距離 *a* のところで、カ *P* をかける。このときレバーがどのように撓むかを考える。**図 A-1b** に示すように、*x* (0 < *x* < *a*)の位置にある断面 mn より右側の部分



図 A-1: カンチレバーにかかる力と釣り合

を切り出して、この部分に左から働くカ F と mn の中心点の周りのカのモーメント M を考える。 釣り合いの条件より、

$$F - P = 0$$
 (A1)  
 $M + P(a - x) = 0$  (A2)

故に、

F = P (せん断力)、 M = -(a-x)P (曲げモーメント) (A3) x(a < x < L)の位置にある断面ではせん断力も曲げモーメントも働いていない。曲げモーメントは 内部応力のモーメントに等しい。z = 0の面は引き延ばされても圧縮されてもいないが、z > 0の面 は引き延ばされ、z < 0の面は圧縮されている。この進展・圧縮を引き起こしている応力のモーメ ントが曲げモーメントに等しくなっている。断面 mn



図 A-2: カンチレバーの歪み

をはさむ縦断面を図 A-2 に示す。zの位置の歪み率( $\varepsilon$ , Strain)は

$$\varepsilon = \frac{z\phi}{R\phi} = \frac{z}{R} \tag{A4}$$

従って、材質のヤング率を  $E(N/m^2)$ とすると、応力( $\sigma$ , Stress)は

$$\sigma = \varepsilon E = E \frac{z}{R}$$
(A5)

となる。従って、mn 断面の中心に関する力のモーメント(M)は

$$M = \int_{S} dS \ \sigma \cdot z = \frac{E}{R} \int z^{2} \ dS = \frac{EI}{R}$$
(A6)

となる。ここで、 $I = \int z^2 dS$ を断面 2 次モーメントと呼ぶ。以上により、

$$\frac{EI}{R} = -(a-x)P \tag{A7}$$

の関係が成り立つ。ここで、曲率半径 R は x の関数であり、

$$\frac{1}{R} = \frac{d^2 z}{dx^2} \left\langle \left\{ 1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2 \right\}^{3/2} \right\rangle$$
(A8)

撓みの少ないときには、 $1/R \approx d^2 z / dx^2$ と近似できる。以上により、次のような撓みを決定する 微分方程式が得られる。

$$\frac{d^2 z}{dx^2} = \frac{P}{EI} \left( x - a \right) \tag{A9}$$

境界条件 (x=0 で、dz/dx=0, z=0) を満足する解が次式のように求められる。

$$z = \frac{P}{6EI} x^2 (x - 3a) \tag{A10}$$

カPをレバーの端に加えたとき、すなわちa = Lのときには、

$$z = \frac{P}{6EI} x^2 (x - 3L) \tag{A11}$$

で、このときレバーの端における変位と撓み角はそれぞれ、

$$z(L) = -\frac{P}{3EI}L^3, \qquad \frac{dz}{dx}\Big|_{x=L} = \frac{P}{2EI}L^2 \qquad (A12)$$

となる。ここで、断面が幅w、厚さdの長方形という条件を入れると、面積2次モーメントはwd<sup>3</sup>/12となるので、レバーの変位及び撓み角について次式を得る。

$$z(L) = \frac{4L^3}{wd^3} \frac{P}{E} \quad , \qquad \frac{dz}{dx}\Big|_{x=L} = \frac{6L^2}{wd^3} \frac{P}{E}$$
(A13)

従って、レバー先端の変位に関するレバーのバネ定数は

$$k_c = \frac{wd^3}{4L^3}E\tag{A14}$$

で与えられる。

次にカンチレバー探針に働く横方向の力で生ずるカンチレバーの撓みについて考える。AFM の ライン走査方向は通常レバーの長軸方向である。探針と試料との間に吸着がある場合には、この走 査により曲げモーメントがレバーに働き、レバーが撓む。Constant Force モードではこの効果は大 きい。レバーに平行にかかる力によりレバーがどのように撓むかを考える。図A3 に釣り合いの状 態の様子を示す。固定端から距離xにある断面における曲げモーメントは

$$M = P(\delta + h - z)$$
 (A15)  
である。レバーの撓みを決める方程式は従って

$$\frac{d^2 z}{dx^2} = \frac{P}{EI} \left( \delta + h - z \right) \tag{A16}$$

で、x = Lで $z = \delta$ となる条件を使ってこれを解くと、

$$z = \frac{h\left(1 - \cos\left(\sqrt{P/EI} x\right)\right)}{\cos\left(\sqrt{P/EI} L\right)}$$
(A17)



撓みが小さいとして(このときhは探針の長さにほぼ等しい)レバー先端の変位及び撓み角は

$$z(L) = \frac{h}{2} \frac{L^2}{EI} P, \qquad \frac{dz}{dx}\Big|_{x=L} = \frac{hL}{EI} P \qquad (A18)$$

レバーの端に関するバネ定数 k' はこの場合

$$k_{c}' = \frac{2EI}{hL^{2}} = \frac{wd^{3}}{6hL^{2}}E = \frac{2L}{3h}k_{c}$$
(A19)

となる。レバーに垂直に力がかかる場合に比べて、水平方向に力がかかる場合は2L/3h倍だけ硬 くなるが、探針と試料との吸着が強い場合や走査中に急に高い箇所に来た場合には横方に大きな力 がかかり、カンチレバーは大きく撓む。

## A-2. 動力学

支持点からxの位置の部分のカンチレバーの面に垂直な方向の運動は、レバーの密度をρ、断面 積をSとすると、

$$\rho S \frac{\partial^2 z(x,t)}{\partial t^2} + EI \frac{\partial^4 z(x,t)}{\partial x^4} = f(x,t)$$
(A20)

で記述される。ここで、f(x,t)は外力である。外力がゼロの場合の自由振動を考えよう。 z(x,t) = G(x)H(t)と変数分離して解くと、一般解は

$$G(x) = C_1 \sin \alpha x + C_2 \cos \alpha x + C_3 \sinh \alpha x + C_4 \cosh \alpha x$$
(A21)  
$$H(t) = D_1 \sin \omega t + D_2 \cos \omega t$$
(A22)

となる。ここで、 $\alpha^4 \equiv \rho S \omega^2 / EI$ である。支持部では変位と傾きがゼロであり、またレバーの自由端では曲げモーメントとせん断力がゼロであるという境界条件より、  $C_1 + C_3 = 0$ 、 $C_2 + C_4 = 0$ となる。また、固有角振動数は

$$\cos\alpha L \cosh\alpha L + 1 = 0 \tag{A23}$$

を満たす。この方程式の根は

 $\alpha_1 L = 1.875$ 、 $\alpha_2 L = 4.694$ 、 $\alpha_3 L = 7.855$ 、--- (A24) である。従って、1 次振動モードの固有角振動数は

$$\omega_1 = \frac{(1.875)^2}{L^2} \sqrt{\frac{EI}{\rho S}} = (1.875)^2 \frac{d}{L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}$$
(A25)

となる。カンチレバーは連続体であるけれどもレバー先端の運動だけに注目することが多いので、 レバー先端を質量のないバネに付けられた質点として扱えることができれば便利である。そこで質 点 と し て 扱 う と き の 有 効 質 量  $m^*$  を  $\omega_1 = \sqrt{k_c/m^*}$  と な る よ う に 定 義 す る と 、  $m^* = 3Lwdp/(1.875)^4 = 0.24m$ となる。ここで、mはレバーの実際の質量である。カンチレバー の撓みのポテンシャルエネルギーVは

$$V = \frac{1}{2} EI \int_0^L \left\{ \frac{d^2 z(x)}{dx^2} \right\}^2 dx$$
 (A26)

と書ける。水中での音響励振の場合のようにカンチレバーに一様な力が働いて撓んだとして、その ときの *z*(*x*)を求めると、

$$z(x) = \frac{1}{3}z(L)\left\{\xi^{4} - 4\xi^{3} + 6\xi^{2}\right\}$$
(A27)

となる。ここで、 $\xi$ はx/Lである。この結果を(A26)式に代入し、 $k_c$ =3*EI*/L<sup>3</sup>を使うと、

 $V = 0.53k_c z(L)^2 となり、ほぼ <math>0.5k_c z(L)^2$  に等しくなる。すなわち、連続体であるカンチレバーの 弾性エネルギーはカンチレバーのバネ定数と自由端の変位を使って、単純なバネの弾性エネルギー の式でほぼ表すことができる。

## 付録 B. PID 制御のシミュレーション

PID 制御の3つのパラメータ、K<sub>p</sub>、T<sub>I</sub>、T<sub>D</sub>の設定の指針を与える限界感度法を本文中で紹介したが、その設定でうまくいく場合もあるであろうが、必ずしも最善とは限らない。AFM のフィードバックループの応答の主な要素は遅延であるので、制御対象の応答はそれほど複雑ではない。それ故、遅延応答さえ把握しておけばラプラス変換を利用したシミュレーションによりパラメータをある程度最適化可能である。ここでその方法を紹介する。式(7)をラプラス変換すると、

$$L[m - m_0] = G_1(s) L[e] = K_p \left( 1 + \frac{1}{T_I s} + T_D s \right) L[e]$$
(B1)

となる。ここで *L*[]はラプラス変換を表す。操作量 *m* は Z ピエゾ電源の出力である(図 3-4 参照)。 この電源における遅れは無視できるとする。操作量 *m* により Z スキャナーが変位するが、通常この ステップで最も大きい遅れが存在する。Z スキャナーは 2 次の共振系と考えられ、その共振角周波 数を *w*<sub>0</sub>、共振の Q 値を *Q* とすると、その伝達関数 *G*<sub>2</sub>(*s*) は

$$G_{2}(s) = \frac{\omega_{0}^{2}}{s^{2} + \frac{\omega_{0}}{Q}s + \omega_{0}^{2}}$$
(B2)

で与えられるので、カンチレバーの振幅
$$A$$
と操作量との関係は $L[A - A_s] = - \alpha G_2(s) L[m - m_0]$  (B2)

で与えられる。ここで、 $A_s$ は振幅の目標値、 $\alpha$ は Z ピエゾの伸び係数である。ここでは、Z ピエ ゾのヒステリシスは無視できる線形素子として扱っている。センサーアンプと RMS-DC コンバー ターの遅れ時間をまとめて  $T_1$  と表すと、振幅と RMS-DC 出力電圧 V との関係は、

$$L[V] = G_3(s) L[A] = \frac{\beta}{1 + T_1 s} L[A]$$
(B3)

で与えられる。ここで、 $\beta$ は振幅-電圧変換係数である。目標値電圧 $V_s$ を変動させてそのときの RMS-DC 出力電圧vがすばやく追随するように PID の 3 つのパラメーターを設定することを考える。ここで、応答関数 G(s)を

$$G(s) = \frac{L[V]}{L[V_s]} \tag{B4}$$

と定義すると、(B1)~(B3)より、

$$G(s) = \frac{\alpha G_1(s) G_2(s) G_3(s)}{1 + \alpha G_1(s) G_2(s) G_3(s)}$$
(B5)

と求められる。目標値電圧 $V_s \in V_s(t)$ として変化させたときの応答は

$$V(t) = L^{-1}[G(s) L[V_s(t)]]$$

によって計算できる。ここで、 $L^{-1}[$ ]は逆ラプラス変換である。この計算は煩雑であるが、 Mathematica や Mathcad のような数式演算ソフトを用いて容易に計算できる。 $V_s(t)$ としてステップ関数を採用した場合( $L[V_s(t)]=1/s$ )の計算結果例を図 B-1 に示す。

(B6)



**図 B1**: PID 制御のシミュレーション結果。目標値をステップ状に変化させたときの RMS-DC 出力 電圧の応答を示す。スキャナーの共振周波数を 150kHz、Q 値を 4、遅れ時間を T<sub>1</sub>=1 µ s とし、a, b, c の順に微分操作を大きくした。

## 付録C Q値制御

AC モードではサイン波振動する外力によりカンチレバーを振動させる。この振動の振る舞いは 探針・試料間の相互作用で変わる。この相互作用をより敏感に検出するためには、相互作用によっ て振動の変化が大きくなるようにする必要がある。この工夫のひとつとしてQ値制御法が考案され た。ここでは、この方法の原理を示すために、粘性の大きさや探針・試料間の相互作用などに制約 を与えて、解析を単純化できる条件下で議論する。 カンチレバーを質量mをもつ質点とバネ定数 $k_c$ をもつバネで近似すると、その運動方程式は次のように表せる。

$$m\frac{d^2z}{dt} + \alpha\frac{dz}{dt} + k_c z = F_0 \sin \omega t + F[z(t)]$$
(C-1)

ここで、右辺第1項は励振力、第2項は探針・試料間に働く力である。単純化のために、カンチレ バーの振幅は極めて小さく、探針・試料間の相互作用は $F(z) \approx F + k_z$ で表されるとする。kは相 互作用力が斥力の場合にはマイナス、引力の場合にはプラスである。この調和的相互作用はカンチ レバーのバネ定数を見かけ上変える( $k_c \rightarrow k_c - k$ )。斥力の場合には見かけのバネ定数は増大し、 その結果カンチレバーの共振周波数は増える。引力の場合には逆に、共振周波数は減少する。励振 力の周波数をもともとのカンチレバーの共振周波数に固定しておくと、相互作用による共振周波数 のシフトによって励振効率は減少し、その結果カンチレバーの振幅は減少する。この減少が大きい ためにはカンチレバーの共振のスペクトルは狭くなければならない(Q値は大きくなければならな い)。実際には粘性の効果によってスペクトルは広がっているので、共振周波数のシフトの振幅へ の効果は大きくない。そこで、Q値を人工的に大きくする方法が考案された。探針・試料間相互作 用が調和的であれば、定常状態におけるカンチレバーの振動もサイン波である。

$$z(t) = A\sin(\omega t - \varphi)$$
(c-2)

従って、

$$\frac{dz}{dt} = \omega A \cos(\omega t - \varphi) = \omega A \sin\left(\omega t - \varphi + \frac{\pi}{2}\right)$$
(C-3)

固定励振力  $F_0 \sin(\omega t) c_g \sin\left(\omega t - \varphi + \frac{\pi}{2}\right)$ を加えると粘性抵抗の係数は $(\alpha - g/\omega A)$ となり、見かけ上減少する。z(t)よりも $\pi/2$ だけ位相が進んだ(位相を進めることはできないので、 $3\pi/2$ だけ位相を遅らせた)信号を固定励振力に加えることにより、粘性抵抗を見かけ上減らすことができ、その結果Q値を増大させることが可能である。

さて、Q値を他のパラメーターでどのように表せるか見てみよう。探針・試料感相互作用がない 場合の運動方程式(c-1)の解は

$$z(t) = \frac{F_0 / m}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\gamma^2 \omega^2}} \sin(\omega t - \varphi)$$
(c-4)  
$$tan \varphi = -2\gamma \omega / (\omega_0^2 - \omega^2)$$
(c-5)

である。ここで、 $\gamma \equiv \alpha/2m$  である。最大振幅を与える周波数は $\tilde{\omega} = \sqrt{{\omega_0}^2 - 2\gamma^2}$ で、最大振幅  $A_0$ 

は $\frac{F_0/m}{2\gamma\sqrt{\omega_0^2-\gamma^2}}$ で与えられる。以下の議論では、粘性は小さく、 $\omega >> \gamma$ が成り立つと仮定する。

この条件下では、 *ῶ ≈ ω*0 で、共振点における位相は 90 度である。共振周波数よりも高い周波数で 励振すると、位相は 90 度よりも大きくなり、逆に低い周波数で励振すると、位相は 90 度よりも小 さくなる。最大振幅の $1/\sqrt{2}$ を与える周波数を $\omega_{\pm}$ とおくと、 $\omega_{\pm} pprox \widetilde{\omega}_{\pm}\gamma$ である。従って、Q値は

$$Q \equiv \frac{\widetilde{\omega}}{\omega_{+} - \omega_{-}} \approx \frac{\omega_{0}}{2\gamma}$$
(c-6)

で与えられる。ところで、運動方程式の非定常時の減衰の緩和時間は $\tau_0 = 1/\gamma$ であるので、

$$\pi_0 = 2Q / \omega_0 = Q / \pi f_0$$

(c-7)

となり、Q値が大きいと緩和が遅くなる。従って、Q値制御でQ値を上げるとカンチレバーの応答 速度が下がる。従って、Q値制御下では高速走査は不可能になることに注意しなければならない。 図 C-1 にQ値制御のダイアグラムを示す。



この図ではセンサー信号の位相とゲインを調整した信号を励振信号に加えているように見えるが、 通常はセンサー信号の振幅情報は受け取らず位相情報だけを受け取ってから位相・ゲインの調整を するのが一般的である。Q値制御の有無によるカンチレバーの応答の違いを図 C-2 に示す。



図 C-2: 自由振動しているカンチレバーの共振特性に対するQ値制御の効果。

Q値制御の有無で、探針・試料間の相互作用によるカンチレバーの応答は図 C-3 に示すように大き く変わる。



図 C-3: 探針・試料との相互作用によるカンチレバーの振る舞いとQ値との関係

この違いは位相を見るとよく分かる。Q値制御のない方(左図)場合には位相は90度より大きい ところから小さいところに遷移する領域が狭い。90度よりも大きいところは引力圏にあり、小さ いところは斥力圏にある。斥力の働くところで探針は基板にぶつかっている。他方、Q値制御をし た場合(右図)では、引力圏が広くなっており、引力を敏感に検出できることを示している。探針 が基板にぶつかる前に振幅はほとんどゼロになっている。

図 C-1 に示したダイアグラムでは、2 種類の励振信号を混ぜている。固定励振信号を加えずに、センサーからの信号を位相・ゲイン調整した信号のみを励振信号にした場合はどうであろうか。カンチレバーはその共振周波数付近でブラウン運動しているので、その運動に基づくセンサー信号はカンチレバーを励振しだす。一旦励振し出せば、ブラウン運動ではなく、きれいなサイン波で振動する。これを自己励振という。この場合には、探針・試料間の相互作用でカンチレバーの共振周波数が変わっても、励振信号の周波数もそれに追随して変わる。従って、共振周波数のシフトにより励振効率が下がることはなく、カンチレバーの振幅は大きくは変わらない。周波数シフト量は僅かで

あるので、カンチレバーの運動エネルギー  $(\frac{1}{2}mA^2\omega^2)$ はほとんど変わらない。それ故、通常の

Q値制御下で測定される振幅の変化の応答は遅いのに対して(見かけの粘性抵抗が小さく、エネル ギー散逸が遅い)、周波数シフトの応答速度はQ値を上げても速いであろう。自己励振に基づくQ 値制御では、カンチレバーの振動と励振信号との位相差は常に 90 度に保たれている。また、探針 が試料にぶつからないかぎり振幅は減少しない。従って、位相・振幅情報は有効ではない(もちろ ん斥力領域での走査では振幅は変化し、トポグラフィー情報を与える)。唯一共振周波数のシフト の情報のみが有効となる。共振周波数を一定に保つようにフィードバックをかけて走査すると、得 られるイメージは等しい力勾配面をなぞった像を与えることになる。共振周波数のシフトの応答は 速いので高速走査と一見両立しそうに思える。しかし、小さい共振周波数のシフトを測定するため にはQ値の極めて高い振動子(水晶やセラミックを利用した電圧制御型のクリスタルオシレータ ー)を活用した PLL 回路は必須であり、この振動子の応答は遅い。従って、高速走査とは両立し えない。図 C-4 に自己励振Q値制御のための回路のダイアグラムを示す。



сгуз al oscillator (VCXO). The PLL block of an input sign al  $(f_0)$  is to the intermediate (IF), which is 4.5 MHz±450 Hz, by frequency mixing with the out-put signal of the local oscillator. The output signal of the VCXO can be make an excitation another frequency mixing.

nd loor e-loo

図 C-4: 自己励振Q値制御のための回路

さて、Q値を高くすることにより探針・試料間の相互作用を敏感に検出でき、振幅情報ばかりでな く、位相情報も活用できる。位相から試料に関してどのような情報が得られるのであろうか。ここ でも議論を簡単にするために粘性は比較的小さく、探針・試料間の相互作用は調和的であり、従っ て、カンチレバーはサイン波で振動すると仮定する。定常状態では、カンチレバーに供給されるエ ネルギーは常に散逸している。この散逸は粘性ダンピング及び探針・試料間相互作用の2経路で起 こる。探針・試料間相互作用で起こる散逸を直接求めることは難しいので、供給されるエネルギー から粘性ダンピングによるエネルギー散逸を引くことで求めてみる。周波数ωで励振したときの振 幅をAとすると、単位時間あたり供給されるエネルギー $\overline{E}_{in}$ は

$$\overline{E}_{in} = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) \dot{z} dt = \frac{1}{T} \omega A F_0 \int_0^T \sin \omega t \cos(\omega t + \varphi) dt = \frac{1}{2} \omega A F_0 \sin \varphi \qquad (c-7)$$

他方、ダンピングによる単位時間当たりのエネルギーの散逸 $\overline{E}_0$ は

$$\overline{E}_0 = \frac{1}{T} \int_0^T 2m \, \gamma \, \dot{z} \, \dot{z} \, dt = \frac{2}{T} m \, \gamma \, A^2 \, \omega^2 \int_0^T \cos^2(\omega t - \varphi) dt = m \, \gamma \, A^2 \, \omega^2 \qquad (c-8)$$

ここで、共振周波数 $\omega_0$ で自由振動しているときの振幅を $A_0$ として、 $F_0 \approx 2m\gamma \omega_0 A_0$ 、 $Q \approx \omega_0 / 2\gamma$ から、 $F_0 = m \omega_0^2 A_0 / Q = k_c A_0 / Q$ を使うと、

$$\overline{E}_{tip} = \frac{1}{2}\omega A \frac{k_c A_0}{Q} \sin \varphi - \frac{1}{2} \frac{m \omega_0}{Q} A^2 \omega^2 = \frac{k_c A^2 \omega}{2Q} \left( \frac{A_0}{A} \sin \varphi - \frac{\omega}{\omega_0} \right) \quad (C-9)$$

$$\overline{E}_{tip} = \frac{1}{2} \frac{k_c A^2 \omega_0}{Q} \left( \frac{A_0}{A} \sin \varphi - 1 \right)$$
(c-10)

こうして、探針・試料間の相互作用によるエネルギーの散逸と位相差との関係が得られた。この相 互作用が保存力であれば、 $\varphi = \arcsin(A_0 / A)$ で、振幅と位相差は独立ではないが、振幅を一定に 保つように走査するので、エネルギーの散逸がある場合にのみ位相差像が得られることがわかる。 位相差像はエネルギーの散逸の起こりやすさを示す像(すなわち粘性に関係する像)であることが 分かる。また、Q値が高いほど同じエネルギーの散逸でも大きな位相差を与えることが分かる。

# 付録D フォースカーブ

カンチレバー探針と試料が離れている状態から試料を近づけていき、接触させ、更に押し込んで から、逆に戻していく過程で検出されるカンチレバーの撓み(カ)を試料ステージの各位置でプロ ットしたものをフォース・ディスタンスカーブ(FD カーブ)という。センサー感度を調べる目的 で AFM では日常的に測定される。或は、探針に付けた物体と試料間との相互作用を調べる目的で も行われる測定である(図 D-1)。



図 D-1 に示すように、接近させていく過程と離していく過程でカンチレバーの撓みが異なる(ヒステリシス)。このヒステリシスがどういうメカニズムで起こるかをここで理解しておこう。探針と試料(或は基板)との間に図 D-2 に示すような相互作用ポテンシャルW(z)が存在するとしよう。



図 D-2 探針・試料間相互作用の ポテンシャルエネルギーのプロ

ファイル

「 試料面から測ったカンチレバー支持部(或はレバーの付け根)の高さをh、レバー先端の高さ(針 の長さは無視して、針先端の高さと同じと考える)をzとする。レバー先端の平衡位置を求めるた めに、バネのポテンシャルエネルギーと試料・探針間のポテンシャルエネルギーの和 $W_T$ を考える。 平衡状態では与えられたhのもとに $W_T$ が最小になるように探針の位置が決まる。 $W_T(z)$ は次のよ うに書ける。

$$W_T(z) = \frac{1}{2}k_c(z-h)^2 + W(z)$$
 (D-1)

図 D-3 に示すように、 $W_T(z)$ はhの値により色々な形をとる。hの大きいところでは極小値は 2


図 D-3 探針・試料相互作用のエネルギ ーとカンチレバーのエネルギーの総和 がカンチレバー・基板間の距離に依存 してどのように変わるかを示す。

ポテンシャル障壁はだんだんと小さくなっていく。hを更に小さくすると、極小位置は1箇所になる。2つの極小位置がある場合、カンチレバーを試料に近づけていったとき、zの大きい方の極小位置が平衡位置になる。そこから僅かにhを小さくすると、ポテンシャル障壁はなくなり、zの小さい方が平衡位置になる。つまり、僅かにhを小さくしただけで、カンチレバー先端はジャンプインする(図 D-1 参照)。探針を試料にさらに近づけたあと引き離していくと、2つの極小位置をもつhになったとき、zの小さい極小位置が今度は平衡位置になる。そこから更にhを大きくしていってもしばらくはポテンシャル障壁を越えることができない。更にhを大きくすると、ポテンシャル障壁を越えてzの大きな極小位置にジャンプする。このようなメカニズムでヒステリシスが起こる。

極小位置が2つあり、それらの間のポテンシャル障壁がたまたま k<sub>B</sub>T オーダーである場合には 2つの極小位置をいったりきたりするようになる。すなわち、カンチレバーは振動するようになる。

ポテンシャルエネルギーの代わりに力でもヒステリシスを考えることができる。全ポテンシャル エネルギー最小の条件より、

$$\frac{\partial W_T}{\partial z} = k_c (z - h) + \frac{\partial W}{\partial z} = 0$$
 (D-2)

となる。従って、

$$-\frac{\partial W(z)}{\partial z} = k_c \, z - k \, h = F(z, h) \tag{D-3}$$

となり、傾きが*k<sub>c</sub>で z* 軸の切片が*h*の直線と*z*の関数としての力の場の曲線との交点が平衡状態を 与える。図D-5に示すように、ひとつの直線に対して交点が2箇所できる場合があることが分かる。 すなわち、ひとつの*h*に対して異なる *z* をもつ平衡状態ができる。全エネルギー最小のためには、

$$\frac{\partial^2 W_T}{\partial z^2} = k - \frac{\partial F}{\partial z} > 0 \tag{D-4}$$

でなければならないので、図 D-5 の点1と3では不安定であり、1の状態は速やかに2の状態に移行し、3の状態は速やかに4の状態に移行する。状態3と1の間の状態は実現されない。すなわち、 状態1の状態にくるとカンチレバーは試料にJump-inし、引き離して状態3にくるとカンチレバー

は Pull-off する。



# 付録 E 針の太さの影響(像の再構成)

試料の真の凹凸形状と針先端部の形状から観察像がどのように構成されるのか。逆に、観察された 像から針先端部の形状効果を除去して試料の真の凹凸形状を再構成する方法はないであろうか。

### E-1. 観察像から真の像への再構成



図 E-1 針と試料との接触

図 E-2 1点における針曲面の高さの比較

図 E-1 を見ると直ぐ分かるが、試料面 S(x, y)に接する針の曲面 t(x, y)はひとつの族を形成する。 この曲面族の包絡面が試料面になっている。また、観察像 I(x, y)は曲面族のひとつひとつの曲面 の頂点を結んだものになっている。2 次元平面 (x, y)にひとつの点 (x', y')をとると、 (x', y', I(x', y'))を頂点とするひとつの針曲面があるであろう。t(x, y)を原点(0,0,0)に頂点をもつ 針曲面の関数とすると、(x', y', I(x', y'))を頂点とする針曲面は次のように表せる。

$$z_t(x, y) = I(x', y') + t(x - x', y - y')$$
 (E-1)

この針曲面は試料面と $(x_t, y_t, S(x_t, y_t))$ で接しているとする。さて、点 $(x_t, y_t)$ を固定しておいて、 (x', y')を色々なところに移動させて、点(x', y', I(x', y'))を頂点とする針曲面を眺めてみよう。そ してそのいくつかの針曲面の点 $(x_t, y_t)$ におけるzの値を見比べてみよう。すると次のことに気づ く。すなわち、点 $(x_t, y_t, S(x_t, y_t))$ で試料面と接している針曲面の点 $(x_t, y_t)$ におけるzの値、つ まり、 $S(x_t, y_t)$ が最小になっている(図 E-2)。従って、観察像と針曲面形状から試料面を見出す には次のようにすればよい。

- O 観察像曲面上に頂点をもつ針曲面族の点(x, y)におけるzの値を調べる。それらのz の値の 最小値 $z_{min}$ を点(x, y)における高さにとると、試料面は $(x, y, z_{min})$ になる。
- $S(x, y) = min imum of the set \{I(x', y') + t(x x', y y'), all(x'y')\}$ (E-2)

こうして、針形状と観察像から真の試料面を再構成できることが分かった。しかし、この方法は完 全ではない。例えば、針が試料の2点で同時に接する場合には、その2点に挟まれた試料の領域は 針と接することがない。従って、観察像にはその領域の情報は全くふくまれない。上記再構成法を 実施すると、この領域の形状は接している針の部分形状で再構成される。

## E-2 針の形状の再構成



図 E-3 試料で針面を走査すると考えると。



図 E-4 スパイクを針で走査すると。

針を試料面の各点に当てるということは、逆に試料を針の面の各点に当てるとも言える。従って 上述の議論で針と試料を交換して、針を固定して試料を走査すると考えると、針の面に接する試料 面はひとつの族を形成し、この曲面族の包絡面が針の曲面になっている。また、この曲面族の頂点 をつないだ面が針の観察像ということになる。上述の再構成法をこれに当てはめれば、試料の形状 があらかじめ分かっている場合には、観察像から針の形状を再構成できることになる。

# E-3 観察される像を計算で求める

試料と針の形状が予め分かっている場合には、観察像を計算で求めることが可能である。まず決まった高さをもつスパイク状の試料を考える。これを針で走査したときに得られる像 t'(x, y)は針の

形状*t*(*x*, *y*)と次の関係になっている(図 E-4)。

$$t'(x, y) = -t(-x, -y)$$
 (E-3)

t'(x,y)はスパイクの上にかぶさった格好になっている。そこで、t'(x,y)をキャップと名付けよう。 スパイクでない一般の試料は色々な高さをもつスパイクの集まりと考えられる。各スパイクにキャ ップをかぶせていくとひとつの包絡面ができる。この包絡面が観察される像となる(図 E-5)。試 料面上の点(x',y',S(x',y'))にキャップをかぶせたときのキャップの式は

z(x,y) = S(x',y') + t'(x-x',y-y') = S(x',y') - t(x'-x,y'-y) (E-4) で与えられる。次のようにして観察像を求めることができる。

O 試料曲面上に頂点をもつキャップ針曲面族の点(x, y)におけるzの値を調べる。それらのzの 値の最大値 $z_{max}$ を点(x, y)における高さにとると、観察像は $(x, y, z_{max})$ になる。

 $I(x, y) = max \, imum \, of \, the \, set \, \{S(x', y') - t(x' - x, y' - y), \, all \, (x' \, y')\}$ (E-5)





図 E-5 試料面にキャップをかぶせて観察像を得る。

図 E-6 針面に試料のキャップをかぶせて観察像を得る。

## E-4 観察像は試料の像か、針の像か?

スパイク状の試料を針で走査すると得られる像は針の像であることからも、観察像が試料の像であ るのか針の像であるのかという疑問が起こる。試料に針のキャップをかぶせて試料の観察像が得ら れるが、針を試料で走査したと考えると、針に試料のキャップをかぶせたものは針の像だといえる (図 E-6)。試料を針で走査しても、針を試料で走査しても同じ像になるはずであるから、結局観 察像とは試料の像でもあるし、針の像だともいえる。針が試料に比べて小さい場合には、観察像は 試料形状を反映し、逆の場合には針形状を反映するといえる。

## E-5 可逆像の定理

上述の観察像から試料形状への再構成、試料形状から観察像への構成は次のようにまとめられる。

- 観察像をスパイクの集まりと考え、各スパイクに上から針を載せたときにできる包絡 面は真の形状に近い再構成像を与える。
- 試料面をスパイクの集まりと考え、各スパイクに針を逆さまにしたキャップをかぶせたとき にできる包絡面は観察像を与える。

### 付録 F 針の太さの影響

1) 針先の曲率半径が試料のそれと同程度か、もしくは大きい場合(図 F-1)。

$$D^2 = (R+r)^2 - (r-R)^2 = 4Rr$$
  $D = 2\sqrt{Rr}$ 

2) 針先の曲率半径が試料のそれより小さい場合



$$D = R\cos\theta + L \qquad L = [R + R\sin\theta + r / \sin\theta - r] \tan\theta$$
$$D = R\cos\theta + \frac{\sin\theta}{\cos\theta} \left[ R + R\sin\theta + \frac{r}{\sin\theta} - r \right] = R \frac{1 + \sin\theta}{\cos\theta} + r \frac{1 - \sin\theta}{\cos\theta}$$

3) r>R の場合の空間分解能

針の球面の中心の高さ変化を識別できる最小の大きさを 与える試料球の間の距離 **D**min。

$$(R+r) - \sqrt{(R+r)^2 - (D/2)^2_{min}} = (\Delta z)_{min}$$
$$D_{min} \approx 2\sqrt{2(\Delta z)_{min}(R+r)} \approx 2\sqrt{2r(\Delta z)_{min}}$$



或は、隣接する半径 R の 2 つの球に接する半径 r の球の高さ(頂点に接するときの高さを引く) を識別できる最小値を与える半径 R の 2 倍が xy 方向の分解能。

$$(R+r)-\sqrt{(R+r)^2}-R>(\Delta z)_{min}$$
の不等式を満足する最小の R の 2 倍。

$$R_{min} = \sqrt{2r(\Delta z)_{min}} + (\Delta z)_{min} \approx \sqrt{2r(\Delta z)_{min}}$$

## 参考文献

#### AFMの最初の論文

Binnig, G., Quate, C.F., & Gerber, C. (1986) Phys. Rev. Lett. 56, 930-933

### 高速 AFM の最初の論文

Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K, & Toda, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **98**, 12468-12472.

Ando, T., N. Kodera, D. Maruyama, E. Takai, K. Saito & A. Toda (2002) *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**:4851-4856 (2002)

#### 高速 AFM の最近の展開

N. Kodera, M. Sakashita, and T. Ando (2006) Rev. Sci. Instrum. 77(8) (in press).

- T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita and M. Sakashita. (2006) *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B):1897-1903.
- T. Uchihashi, N. Kodera, H. Itoh, H. Yamashita and T. Ando. (2006) *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**(3B):1904-1908 (2006).
- T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita and K. Matada (2005) *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **3**:384-392.
- N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando (2005) Rev. Sci. Instrum. 76: 053708 (5pages).
- Ando, T., N. Kodera, Y. Naito, T. Kinoshita, K. Furuta & Y.Y. Toyoshima (2003) *ChemPhysChem* **4**: 1196-1202.

## AFM の教科書

R. Weisendanger "Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and applications" Cambridge University Press (1994)

Dror Sarid "Scanning Force Microscopy; with applications to electric, magnetic, and atomic forces" Oxofrd University Press (1991)

### 分子間力の教科書

イスラエルアチヴィリ, J.N. (1996) 分子間力と表面力 第2版 朝倉書店

#### Bell の理論

G.I. Bell (1978) Science 200:618-627.

# Evans の理論と実験例

- E. Evans, K. Ritchie & R. Mercel, (1995) *Biophys. J.* 68:2580-2587.
- E. Evans & K. Ritchie (1997) *Biophys. J.* 72:1541-1555.
- E. Evans (2001) Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30:105-128.
- E. Ludwig & E. Evans (2000) *BIF Futura* **15**:96-103.
- R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie & E. Evans (1999) Nature 397:50-53.